

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉVALUATION DE LA BIODISPONIBILITÉ DES MÉTAUX ET DES
MATÉRIAUX ÉNERGÉTIQUES DANS DES SOLS PROVENANT DE SITES
D'ENTRAÎNEMENT MILITAIRE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
AU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
YANN BERTHELOT

SEPTEMBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Voici la petite partie où l'on peut exprimer une goutte de sentiments et la subjectivité inhérente dans cet océan d'objectivité scientifique... Il n'est pas évident de rendre les impressions souvent mélangées que l'on a pu avoir au cours de ces années de doctorat.

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de thèse, Pierre Yves Robidoux, qui m'a offert l'opportunité de revenir au Québec et de réaliser ces travaux de recherche en m'accueillant au sein de son équipe. Malgré son emploi du temps bien chargé, il a su trouver des moments pour ses étudiants mais surtout, il nous considère d'égal à égal et encourage notre autonomie et nos initiatives. Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à Bertin Trottier, mon co-directeur. En effet, nouvellement retraité alors que je débutais mon doctorat, il a quand même accepté de m'encadrer en plus de tous mes collègues de maîtrise. Il m'a fait profiter de son expertise et de ses conseils judicieux. Avant tout, il a investi une énergie et une quantité de temps substantielle pour honorer son engagement envers moi, ce à quoi je suis particulièrement sensible. Je tiens à saluer Philip Spear pour sa contribution aux réflexions sur l'orientation à donner au projet de recherche dans lequel s'inscrivent ces travaux de doctorat. Je suis également reconnaissant aux personnes de l'équipe de l'université de ma ville natale, Le Havre (France), pour leur soutien dans tous mes projets d'études à l'étranger.

Ensuite, je veux remercier toutes les personnes (dont certaines sont devenues des amis) qui ont égayé mon quotidien de ces années passées à l'IRB et aussi l'atmosphère de l'équipe d'écotoxicologie appliquée qui, malheureusement, en a bien besoin. Alors merci Aurélie, Loïc, Marie-Claude et Virginie! On s'est bien marré... Je suis reconnaissant envers Kathleen et Manon pour leur gentillesse, leur générosité et leur aide. Un merci particulier à Émeline pour sa contribution notable à cette étude. J'adresse également ma gratitude à Bernard Lachance et Fanny Monteil pour avoir gentiment partagé leurs connaissances avec moi.

Enfin, toute cette entreprise n'aurait pas été possible sans les encouragements indéfectibles de la famille et des amis proches. A ce chapitre, un immense merci à ma femme, Hélène, pour son soutien inconditionnel et pour avoir supporté toutes mes

fluctuations de motivation, ce qui me permet d'arriver à terme. Aussi, une profonde pensée pour toute ma famille en Europe, mes parents, mon frère Björn et ma sœur Lisa en particulier, qui m'a beaucoup épaulé et inspiré. Un grand merci à tous mes amis d'ici et de là-bas pour leurs encouragements, notamment Guillaume et Catherine pour tous ces bons moments passés ensemble (et à venir) ainsi que ces bons petits « crânes » partagés et réconfortants. Tack för allt !

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 La biodisponibilité des contaminants dans les sols.....	4
1.1.1 Terminologie et définitions.....	4
1.1.2 Biodisponibilité et sols.....	7
1.1.3 Niveau actuel de l'intégration de la biodisponibilité dans le cadre réglementaire et la gestion des sols contaminés.....	16
1.2 Le ver de terre : une sentinelle significative et pertinente pour les sols	18
1.2.1 Présentation de l'organisme et intérêt en écotoxicologie.....	18
1.2.2 L'organisme à l'étude : le ver <i>Eisenia andrei</i>	20
1.2.3 La biodisponibilité des contaminants dans le sol et les vers de terre.....	22
1.2.4 Les outils d'évaluation de la biodisponibilité pour les vers de terre.....	25
1.3 Les substances toxiques investiguées	31
1.3.1 Les matériaux énergétiques.....	31
1.3.2 Les métaux.....	37
CHAPITRE 1.....	41
1.1 Résumé - Abstract.....	42
1.2 Introduction.....	45
1.3 Materials and methods.....	49
1.3.1 Chemicals and reagents.....	49
1.3.2 Soil characteristics and handling	49
1.3.3 Earthworms	52

1.3.4	Earthworm reproduction test.....	52
1.3.5	Bioaccessibility assessment	53
1.3.6	Chemical analyses.....	54
1.3.7	Quality control	56
1.3.8	Data analysis	56
1.4	Results	57
1.4.1	Physico-chemical characteristics of soils.....	57
1.4.2	Incidence of worms presence on soil pH	58
1.4.3	Bioaccessible Pb and soluble HMX levels in the two soils	59
1.4.4	Comparative toxicity of Pb and HMX in the RDDC2004 and the RacFor2002 soils	61
1.5	Discussion.....	62
1.5.1	Soil profiles and impact of earthworms on pH	62
1.5.2	Bioaccessibility of Pb, HMX availability and the effect of worms in two soils	65
1.5.3	Comparative toxicity of Pb and HMX in two soils with contrasting profiles	69
1.6	Conclusion.....	74
1.7	Acknowledgements.....	75
1.8	References.....	77
	CHAPITRE II.....	104
2.1	Résumé - Abstract.....	105
2.2	Introduction.....	108
2.3	Materials and methods.....	111
2.3.1	Chemicals and reagents.....	111
2.3.2	Soil characteristics and handling	111
2.3.3	Earthworm rearing and preparation	113
2.3.4	Short-term exposure.....	114
2.3.5	Chronic exposure	114
2.3.6	Biomarker measures.....	115
2.3.7	Bioaccessibility assessment	119

2.3.8	Chemical analyses.....	120
2.3.9	Quality control	121
2.3.10	Data analysis	121
2.4	Results	122
2.4.1	Physico-chemical characteristics of soils.....	122
2.4.2	Contaminant concentrations in soils	123
2.4.3	Bioaccessible levels in soils.....	124
2.4.4	Contaminant concentrations in earthworm tissue	124
2.4.5	Responses of earthworms	125
2.5	Discussion.....	126
2.5.1	Soil characteristics and contaminant concentrations in soils	126
2.5.2	Bioaccessible levels in soils.....	129
2.5.3	Earthworm body residues	133
2.5.4	Toxicity of Gagetown soils to earthworms and biomarker responses	135
2.6	Conclusion	138
2.7	Acknowledgements.....	140
2.8	References.....	141
CHAPITRE III		167
3.1	Résumé - Abstract.....	168
3.2	Introduction.....	171
3.3	Materials and methods	176
3.3.1	Datasets.....	176
3.3.2	Multiple regression analysis	177
3.3.3	Model sensitivity analysis.....	177
3.3.4	Integrated biomarker response calculation	178
3.4	Results	180
3.4.1	Modulation of bioaccessibility by soil physico-chemical properties.....	180
3.4.2	Relationships between biomarker responses and bioaccessibility or tissue concentrations	181
3.4.3	Integration of biomarker responses.....	183
3.5	Discussion.....	183

3.5.1	Bioaccessibility as a function of soil properties.....	183
3.5.2	Relationships between biomarkers and bioaccessible or tissue concentrations	188
3.5.3	Integrated biomarker response	190
3.6	Conclusion	193
3.7	Acknowledgements.....	194
3.8	References.....	196
CONCLUSION GÉNÉRALE.....		214
ANNEXE A		220
RÉFÉRENCES GÉNÉRALES		222

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Diagramme conceptuel des processus de biodisponibilité dans un sol.....	5
1.2	Diagramme schématique de la relation hiérarchique entre les réponses écotoxicologiques mesurées à différents niveaux d'organisation biologique.....	15
1.3	Le ver de terre <i>Eisenia andrei</i>	21
1.4	Diagramme du cycle de vie d' <i>Eisenia fetida andrei</i> élevé dans du fumier de vache à une température de 25°C et une humidité de 75%.....	22
1.5	Modèle schématique de la biodisponibilité pour les vers de terre.....	24
1.6	Structure moléculaire du TNT, du RDX et du HMX.....	32
2.1	Evolution of mean soil pH throughout test period in the presence of worms in RDDC 2004.....	93
2.2 (a)	Mean soil bioaccessible Pb levels in RDDC 2004 throughout the test period in the presence and absence of <i>E. andrei</i>	94
2.2 (b)	Mean soil bioaccessible Pb levels in RacFor2002 throughout the test period in the presence and absence of <i>E. andrei</i>	95
2.3 (a)	Mean soil accessible HMX levels (expected bioaccessible) in RDDC 2004 throughout the test period in the presence and absence of <i>E. andrei</i>	96
2.3 (b)	Mean soil accessible HMX levels (expected bioaccessible) in RacFor2002 throughout the test period in the presence and absence of <i>E. andrei</i>	97
2.4	Effects of Pb exposure on <i>E. andrei</i> reproduction endpoints in RDDC 2004 soil	98

2.5	Effects of HMX exposure on <i>E. andrei</i> reproduction endpoints in RDDC 2004 soil.....	99
3.1	Sampling plan, Wellington Anti-Tank (WAT) Range, Canadian Forces Base of Gagetown (NB).....	160
3.2	Mean lysosomal neutral red retention time (NRRT) determined for earthworms exposed to Gagetown soil samples under laboratory conditions.....	161
3.3	Mean SOD activity measured for earthworms exposed to Gagetown soil samples under laboratory conditions.....	162
4.1	Global index of biomarker response (IBR) of Gagetown soils.....	213
A.1	Localisation de la Base des Forces Canadiennes (BFC) Gagetown, NB, Canada.....	221

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1	Émissions mondiales de métaux traces vers le sol..... 8
1.2	Propriétés du sol déterminantes pour la compréhension des interactions contaminant-sol..... 11
1.3	Effets aigus et chroniques du HMX pour <i>Eisenia</i> sp. dans différents types de substrat..... 36
1.4	Toxicité chronique du plomb pour <i>Eisenia</i> sp. dans différents types de substrat 40
2.1	Physical characteristics of RacFor2002 and RDDC 2004 soils..... 100
2.2	Background total metal concentrations (mg.kg ⁻¹ dry soil) in RacFor2002 and RDDC 2004 soils..... 101
2.3	Comparative summary of bioaccessibility and partitioning data for Pb and HMX in RacFor2002 and RDDC2004 soils..... 102
2.4	Comparative summary of toxicity data for Pb and HMX in RacFor2002 and RDDC2004 soils..... 103
3.1	Physico-chemical characteristics of Gagetown WAT Range soil samples. 163
3.2	Energetic compound (EC) and metal contamination profiles of Gagetown WAT Range soils..... 164
3.3	Bioaccessible levels of HMX and metals measured in Gagetown WAT Range soil samples at t=0..... 165
3.4	Metal body burdens measured in earthworms after 28 days of exposure to Gagetown soil samples..... 166

4.1	Summary of biomarker data acquired upon exposure of <i>Eisenia andrei</i> to contaminated soils from the Wellington antitank firing range (WAT) on the Canadian Forces Base at Gagetown (NB, Canada).....	208
4.2	Summary of the physico-chemical properties, soil contamination data and <i>Eisenia andrei</i> body residues data obtained during the exposure of earthworms to soils from the Wellington antitank firing range (WAT) on the Canadian Forces Base at Gagetown (NB, Canada).....	209
4.3	Linear multiple regressions between bioaccessible/soluble contaminant concentrations and soil physico-chemical properties.....	210
4.4	Linear multiple regressions between biomarker responses and bioaccessible/soluble or tissue contaminant concentrations.....	211

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Al _{ox}	Amorphous aluminium oxide (Oxyde d'aluminium amorphe)
AP	Acid phosphatase
BFC (CFB)	Base des forces canadiennes (Canadian forces base)
BI	Biomarker index
BSS	Balanced salt solution
CAT	Catalase
CBR	Critical body residue
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
CE _p (EC _p)	Concentration ayant un effet pour un pourcentage p des organismes exposés
CEC	Capacité d'échange cationique (Cation exchange capacity)
CI	Confidence interval
CL _p (LC _p)	Concentration létale pour un pourcentage p des organismes exposés
CMEO (LOEC)	Concentration minimale avec effets observés (Lowest observed effect concentration)
CNRC	Conseil national de recherches du Canada
COT (TOC)	Carbone organique total (Total organic carbon)
CSEO (NOEC)	Concentration sans effet observé (No observed effect concentration)
CTSE (RTA)	Champ de tir et secteur d'entraînement (Range and training area)
DF	Discriminatory factor
DL	Discriminatory level
DOC	Dissolved organic carbon
DTPA	Acide diéthylène-triamine-pentaacétique
Eco-SSL	Ecological soil screening Level
EDTA	Éthylène-diamine-tétraacétique
Fe _{ox}	Amorphous iron oxide (Oxyde de fer amorphe)
f _{oc}	Contenu (fraction) de carbone organique

GST	Glutathione S-transferase
HMX	High melting explosive (1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine)
HPLC	High performance liquid chromatography
IBR	Index of biomarker response
ICP-AES	Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
IRB	Institut de recherche en biotechnologie
K_d	Coefficient de distribution
K_{ow}	Coefficient de partage octanol-eau
MDA	Malonedialdehyde
ME (EM)	Matériau énergétique (Energetic material)
NG	Nitroglycérine
OCDE (OECD)	Organisation de coopération et de développement économique (Organisation for economic cooperation and development)
OM	Organic matter
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrophénol
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrophényl phosphate
RDDC (DRDC)	Recherche et développement défense Canada (Defence research and development Canada)
RDX	Royal demolition explosive (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine)
RF	Response factor
RR	Response range
SOD	Superoxyde dismutase
SSL	Sassafras sandy loam
TNT	2,4,6-trinitrotoluène
TRRN (NRRT)	Temps de rétention du rouge neutre (Neutral red retention time)
WAT	Wellington Anti-Tank
WHC	Water-holding capacity
WST-1	4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate

RÉSUMÉ

Les activités militaires sont la source d'une contamination importante des sols par des matériaux énergétiques ou explosifs tels que le HMX, le RDX ou le TNT et par de nombreux métaux. Cette situation se rencontre notamment au Canada. La toxicité individuelle (et même de certains mélanges) de ces contaminants est bien connue et laisse, à priori, présager de risques pour les organismes et les écosystèmes. Cependant, la forme sous laquelle se retrouvent les contaminants porte à croire que leur biodisponibilité pourrait être limitée. Celle-ci constitue donc un facteur clé, comme dans la plupart des cas de pollution. Or, il s'agit d'un paramètre qui résulte de plusieurs processus relevant de plusieurs disciplines différentes d'où la difficulté d'en cerner la notion et la pluralité de définitions qu'on en trouve. Dans cette étude, nous avons considéré la biodisponibilité comme une variable à caractère toxicologique et la bioaccessibilité comme une variable chimique, incorporée à la biodisponibilité. De par sa nature même, la quantification de la biodisponibilité requiert une approche intégrée incluant des indicateurs biologiques et chimiques pertinents.

Dans un premier volet, deux sols de texture très différente (l'un prélevé sur une base militaire et l'autre, de type forestier) ont été amendés avec du Pb ou du HMX puis évalués quant à leur toxicité envers *Eisenia andrei* et leur biodisponibilité respective. Nous avons aussi déterminé l'incidence de la présence de vers sur le pH du sol et sur la bioaccessibilité du Pb et les teneurs de HMX soluble. La présence de vers a fait augmenter significativement le pH du sol de type militaire mais aucun effet n'a été relevé dans le sol forestier. En contrepartie, la bioaccessibilité du Pb à la fin de la période d'exposition était significativement réduite dans le premier cas mais augmentée dans le second. Aucune variation significative de cet ordre n'a été observée avec le HMX. En outre, la bioaccessibilité du Pb et les concentrations en HMX soluble étaient supérieures dans le sol provenant de la base militaire. En termes de toxicité, le Pb et le HMX se sont avérés tous deux significativement plus toxiques dans le sol d'origine militaire que dans le sol forestier (CE_{50} pour effets sur la reproduction de *E. andrei* de 81 mg.kg⁻¹ contre 1068 pour le Pb et 9.1 contre 31 pour le HMX). Une différence de biodisponibilité est donc fort vraisemblablement à l'origine de l'écart de toxicité constaté entre les deux sols.

Une seconde étude a porté sur la biodisponibilité et la toxicité des contaminants dans les sols d'une base militaire canadienne. Nous y avons mesuré des indicateurs chimiques comme les teneurs en contaminants, des paramètres toxicologiques conventionnels et une batterie de biomarqueurs (enzymes antioxydants, détoxification et paramètres lysosomiaux) chez *E. andrei*. Nos résultats indiquent que ces sols sont contaminés par du HMX et plusieurs métaux dont les principaux sont le Cu, le Pb, le Zn, le Bi, le Cr, le Ni et le Cd. Les substances les plus accessibles dans les sols étaient le HMX ainsi que le Bi, le Pb, le Zn et le Cd. Tout comme pour le sol militaire témoin utilisé lors des expériences avec ajout de toxique, le pH de la majorité des sols était plus élevé au terme de la période d'exposition. Quant aux concentrations tissulaires des contaminants chez *E. andrei*, les éléments prépondérants étaient le Cu, le Zn et le Bi. L'accumulation préférentielle de ces substances pourrait s'expliquer en termes de bioaccessibilité, de mécanisme de détoxification ou de compétition entre certains

éléments comme le Bi et le Pb. A l'exception d'un sol dans lequel de la létalité a été observée, les résultats de toxicité chez *E. andrei* étaient de nature sous-létale avec toutefois une inhibition complète de la reproduction dans les échantillons contaminés. Les réponses majeures des biomarqueurs étaient une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase et une réduction du temps de rétention du rouge neutre (fragilisation de la membrane lysosomiale). La réponse du rouge neutre concorde avec les gradients de métaux dans les sols. Quant à l'effet sur la SOD, nous postulons que le HMX pourrait générer un stress oxydant responsable de son activation.

En dernière partie de notre travail, nous avons soumis les résultats rapportés dans la section précédente à une analyse statistique relativement complexe. Au moyen de modèles et d'outils propres à mettre en lumière des associations entre les variables potentiellement impliquées dans la biodisponibilité nous avons tenté de dégager une évaluation synthétique de la biodisponibilité dans ces sols de type militaire. Nous avons exploré les régressions linéaires entre les caractéristiques physico-chimiques du sol et les concentrations de contaminants bioaccessibles, d'une part, ainsi qu'entre ces dernières et les réponses des biomarqueurs ou les concentrations dans les tissus, d'autre part. Une récente procédure de compilation d'un indice global de biomarqueurs a finalement été appliquée sur les sols étudiés afin d'obtenir un indicateur de leur qualité. Les régressions linéaires obtenues confirment l'existence d'une corrélation inverse entre le pH et la disponibilité des métaux d'une part et le potentiel de sorption des argiles, de la matière organique et des oxydes métalliques amorphes d'autre part. Des équations ont même été dérivées pour le Bi et le HMX (composés peu caractérisés jusqu'ici). Une relation marquante est ressortie entre les concentrations de contaminants bioaccessibles et les biomarqueurs, notamment la contribution du HMX à l'activité de la SOD, ce qui corrobore l'hypothèse d'un potentiel pro-oxydant du HMX. Enfin, les indices intégrés de biomarqueurs quant à la qualité des sols militaires concordent tant avec les niveaux de contamination qu'avec les réponses et la sensibilité des différents biomarqueurs.

Globalement, les résultats générés dans la présente étude de la biodisponibilité envoient donc aux gestionnaires de ces sols militaires un signal à l'effet que plusieurs substances délétères pour l'environnement y sont peut-être plus biodisponibles qu'on ne le croyait, ce qui en augmente d'autant les risques pour les organismes vivants.

Mots-clés : Approche intégrée; Biodisponibilité; Bioaccessibilité; Biomarqueurs; *Eisenia andrei*; Explosifs; Métaux; Sols

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les activités militaires telles que la production, l'entreposage et l'élimination des munitions ou leur utilisation (entraînement) sont à l'origine d'une contamination des sols des sites de la Défense Nationale par divers métaux (*e.g.* Cu, Cr, Pb, Zn) et des matériaux énergétiques (ME) comme le TNT (2,4,6-trinitrotoluène), le HMX (1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine) et le RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). En effet, ces explosifs sont utilisés comme agents propulseurs ou détonants dans les munitions à usage militaire (Yinon, 1990; Card et Autenrieth, 1998) tandis que les métaux proviennent de l'enveloppe de celles-ci (Robidoux *et al.*, 2004a). Or, les concentrations de ME et de métaux relevées dans les sols de bases militaires à travers le monde, y compris le Canada (Philips *et al.*, 1993; Bricka *et al.*, 1994; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004; Wingfors *et al.*, 2006) excèdent souvent les seuils de toxicité sous-létaux et parfois même létaux pour des bioindicateurs tels que les vers de terre établis en laboratoire ou sur le terrain (Efroymsen *et al.*, 1997; Robidoux *et al.*, 2000a, 2002, 2004a, 2004b). De plus, les niveaux de contaminants sur les bases canadiennes dépassent parfois les critères déterminés avec le scénario industriel du CCME pour les métaux (CCME, 1999) et les critères proposés par Robidoux *et al.* (2006) dans le cas des explosifs, notamment le HMX.

Néanmoins, comme la contamination des sols de sites militaires par les ME est hétérogène et que les métaux sont en majorité présents sous forme de fragments d'obus réfractaires, les risques pour l'environnement et la santé humaine ne peuvent être complètement évalués sur la base des observations précédentes. En effet, la biodisponibilité de ces toxiques dans les terrains militaires est, à cet égard, un facteur essentiel qui est mal défini. Des études récentes avec des vers de terre concernant des sols de la base militaire de Wainwright (Alberta) contaminés par du HMX et des métaux ont montré que la toxicité observée différait de celle obtenue en laboratoire et n'était pas corrélée avec les teneurs en HMX dans les sols ou leurs éluviats (Robidoux *et al.*, 2004a, b). Ces auteurs ont donc suggéré que la présence d'autres contaminants, principalement des métaux et la biodisponibilité *in situ* expliqueraient

ces résultats. Dans la perspective d'une évaluation exacte des risques et pour une gestion adéquate des sites militaires, il devient important de définir la biodisponibilité des deux classes de xénobiotiques majeures retrouvées dans les sols subissant des opérations militaires : les explosifs et les métaux. Le HMX fait partie des ME les plus fréquemment décelés dans les sols utilisés à des fins militaires, particulièrement les zones d'entraînement avec de l'artillerie lourde comme les périmètres de tir anti-tank (Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004). Parmi les métaux, le Cu, le Cr, le Pb et le Zn sont généralement les plus abondants mais le Cd est aussi potentiellement problématique du fait de sa toxicité bien avérée.

Dans ce contexte, un projet de collaboration a été établi entre l'organisme Recherche et Développement Défense Canada (RDDC) de la Défense Nationale et le groupe d'Écotoxicologie appliquée de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) - Conseil National de Recherches du Canada (CNRC) pour mener des activités de recherche sur les sols contaminés par les ME et les métaux. Ce projet a été réalisé entre 2002 et 2005 et comportait plusieurs thématiques dont la principale était de déterminer la biodisponibilité des contaminants dans les sols militaires au moyen d'outils chimiques et biologiques. Il s'agissait également de mieux caractériser les effets toxiques de ces sols, surtout les possibles interactions entre polluants et ce, en appliquant des indicateurs de toxicité standard et des biomarqueurs, préalablement développés et/ou validés si nécessaire. L'espèce bioindicatrice qui a été retenue pour ces investigations est le ver de terre *Eisenia andrei*. C'est un organisme sentinelle pertinent pour les écosystèmes terrestres et qui est grandement utilisé dans les études en laboratoire.

Plusieurs étudiants de cycle supérieur ou de premier cycle ont contribué à ce projet. Ainsi, Kathleen Savard, qui a réalisé une Maîtrise en biologie à l'UQÀM s'est intéressée aux effets combinés des mélanges explosif-métal sur différents paramètres sous-létaux (indicateurs standards et biomarqueurs du stress oxydant) en adoptant le HMX et le Pb comme toxiques modèles. Aurélie Auroy, étudiante dans le même programme, a examiné les effets sur une batterie de biomarqueurs cellulaires du ver de terre (fragilité de la membrane lysosomiale,

activité de la phosphatase acide, potentiel phagocytaire). Je tiens d'ailleurs à remercier Aurélie pour son aide précieuse et sa participation notable à la réalisation des mesures de temps de rétention de rouge neutre chez les vers exposés aux sols de Gagetown dont les résultats sont rapportés dans cette thèse. Quant à Matthias Blanchard, également en Maîtrise de biologie, il a étudié la fonction des protéines de type métallothionéines et leur relation éventuelle avec la reproduction chez *Eisenia andrei* dans le cadre d'une contamination des sols par des métaux ou des explosifs. Je souligne ici sa contribution à l'exécution conjointe des tests de toxicité avec le plomb et le HMX dans le sol RDDC2004, issu de la base militaire de Valcartier. Enfin, Emeline Valton, étudiante en Diplôme Universitaire de Technologie « Analyses Biologiques et Biochimiques » à l'Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand (France) a largement participé à l'évaluation de la toxicité des sols provenant de la base militaire de Gagetown (Nouveau-Brunswick) en analysant la réponse d'une série de biomarqueurs biochimiques et cellulaires chez *Eisenia andrei* et dont les résultats sont présentés dans cette thèse.

L'hypothèse de travail sous-tendant les travaux présentés ici était que la biodisponibilité des contaminants dans les sols à vocation militaire serait limitée, vu la forme sous laquelle ils sont introduits dans l'environnement. Dans ce cadre, l'objectif général des travaux de recherche de doctorat exposés dans ce document était de déterminer la biodisponibilité des explosifs et des métaux dans les sols issus de sites dédiés aux opérations militaires. Cet objectif général se décline en trois objectifs spécifiques. Premièrement, il s'agissait d'étudier la biodisponibilité et la bioaccessibilité d'un métal et d'un explosif dans deux types de sols naturels différents. Pour ces expériences en sol amendé, le Pb et le HMX ont été retenus en tant que contaminants représentatifs. Deuxièmement, il s'agissait d'évaluer la biodisponibilité dans un cas réel, à savoir des sols issus d'une base militaire et contaminés *in situ*. Pour ce faire, une approche intégrée incluant des outils chimiques (mesure de concentrations obtenues avec différents types d'extraction) et biologiques (paramètres de toxicité standard et ensemble de biomarqueurs chez le ver *Eisenia andrei*) a été adoptée afin d'appréhender adéquatement cette variable composite qu'est la biodisponibilité des contaminants dans l'environnement. Enfin, le troisième objectif était de réaliser une synthèse des informations générées dans le deuxième volet du projet à l'aide d'outils intégrateurs afin

d'en tirer les implications pour le secteur militaire et la gestion de ses terrains contaminés. Cette thèse de doctorat présente les résultats obtenus lors de ces investigations.

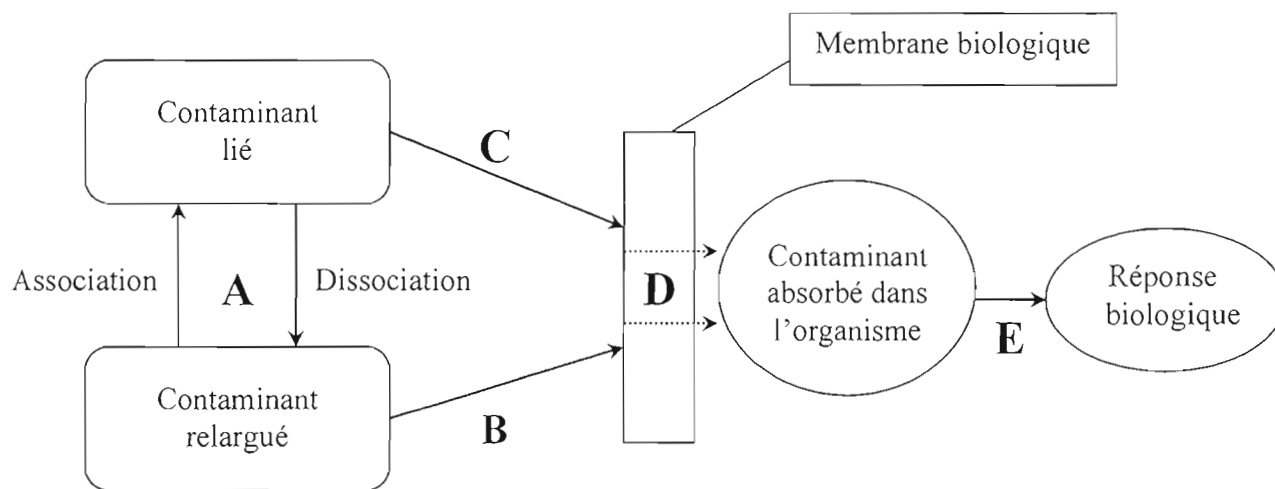
I.1 La biodisponibilité des contaminants dans les sols

I.1.1 Terminologie et définitions

La biodisponibilité est un concept qui comporte plusieurs facettes se rapportant à la fois à des notions de chimie de l'environnement et de biologie. Ainsi, il n'existe pas pour le moment de définition unifiée et consensuelle pour ce terme ni de procédure universelle destinée à évaluer la biodisponibilité (NRC, 2003; Peijnenburg et Jager, 2003; Semple *et al.*, 2004). Le problème réside dans le fait que chaque discipline a sa propre compréhension de cette notion (Baveye et Bladon, 1999). De façon simplifiée mais générale, les chimistes y verraient plutôt un équilibre s'établissant entre différentes phases ou compartiments tandis que les biologistes, et plus particulièrement les toxicologues, y percevraient un processus modulant la toxicité des polluants envers les organismes exposés. Pour ces raisons, diverses significations ont été attribuées au concept de biodisponibilité selon la spécialité de l'auteur. L'ouvrage du NRC (2003) résume la plupart de ces définitions et on préfère alors y parler de « processus de biodisponibilité » afin d'éviter les confusions. Dans un sens large, les processus de biodisponibilité sont décrits comme la capacité d'un produit chimique à interagir avec le règne vivant. Une autre définition générale de la biodisponibilité est « une mesure du potentiel d'une substance chimique à pénétrer dans un récepteur biologique. Ce potentiel est spécifique au récepteur, la voie d'entrée du composé, le temps d'exposition et la matrice contenant le contaminant » (Anderson *et al.*, 1999). Semple *et al.* (2004) ont également proposé une acception générique de la biodisponibilité afin de pallier à l'ambiguïté qui prévaut dans ce domaine. Un élément important qui ressort déjà à ce stade de cet exposé sur le débat sémantique et les multiples définitions proposées est l'intérêt de considérer la biodisponibilité de façon globale et donc de l'appréhender avec une démarche intégrée de nature multidisciplinaire et même transdisciplinaire (Fent, 2004). En réalité, la

biodisponibilité peut être décrite comme un processus séquentiel composé de plusieurs étapes consécutives (figure 1.1).

Dans cette représentation, quatre principaux phénomènes (A-D) déterminent la biodisponibilité d'un toxique. La partie A correspond au processus d'interaction du composé entre les différentes phases de la matrice. Cet événement relève essentiellement de facteurs chimiques du milieu, bien que les organismes vivants puissent également l'influencer de manière indirecte (via une modulation desdits facteurs chimiques). Les stades B et C englobent les processus de transport depuis la phase particulaire (liée) ou dissoute du contaminant vers le récepteur biologique. Ces phénomènes sont souvent regroupés sous la désignation « transport et sort des contaminants ».



Processus de biodisponibilité selon NRC (2003) (A, B, C, et D) et selon notre appréciation (+ E)

Interactions du contaminant entre les phases	Transport des contaminants à l'organisme	Passage à travers la membrane physiologique	Circulation dans l'organisme, accumulation dans les organes cibles, toxicocinétique et toxicodynamique
--	--	---	--

Figure 1.1. Diagramme conceptuel des processus de biodisponibilité dans un sol. Note : A, B et C peuvent avoir lieu au sein d'un organisme comme dans le lumen du système digestif. Adapté de NRC (2003) et traduit en français.

Lors de cet épisode, les processus chimiques sont aussi prédominants mais les organismes peuvent avoir une incidence à ce niveau, notamment de par leurs mouvements ou en modifiant leur environnement (sécrétions). Ensuite, lorsque la substance se retrouve en contact avec le récepteur potentiel, survient l'étape de pénétration du toxique dans l'organisme (D), qui s'opère à travers une barrière physiologique telle qu'une membrane cellulaire ou le tégument. A ce stade, les paramètres biologiques deviennent prépondérants car dépendants de l'organisme-cible. Enfin, la séquence E symbolise l'ensemble des traitements que subit le contaminant une fois dans l'organisme (métabolisation-détoxication, transport et stockage dans l'organisme ou induction d'une toxicité). Souvent, la biodisponibilité proprement dite est considérée comme la résultante des phases A à D du fait que le milieu n'est plus impliqué au stade E (NRC, 2003; Fent, 2004). Cependant, tel que souligné par Fent (2004), la biodisponibilité constitue un facteur crucial en écotoxicologie car il est étroitement relié à la toxicité d'un composé. Ainsi, certains auteurs préfèrent inclure le sort du contaminant une fois au sein de l'organisme et ce, jusqu'au stade où s'exerce la toxicité (Lanno *et al.*, 2004). La phase E de la figure 1.1 est alors parfois qualifiée de « biodisponibilité toxicologique » (Peijnenburg et Jager, 2003; Lanno *et al.*, 2004) et dépend du sort du contaminant dans l'organisme et des mécanismes physiologiques auxquels il sera soumis. Il est vrai que d'un point de vue toxicologique, les processus auxquels sont soumis les contaminants dans l'organisme sont importants. En réalité, tout comme Lanno *et al.* (2004), on peut même prôner que seul le récepteur biologique peut déterminer si un toxique est biodisponible ou non. Dans ces conditions, il résulte qu'un outil chimique ne peut être considéré comme une mesure de biodisponibilité qu'en conjonction avec un indicateur biologique auquel il doit être corrélé (McMillen *et al.*, 2003; Lanno *et al.*, 2004).

C'est ce genre de conception globale de la biodisponibilité que nous avons décidé d'adopter dans le cadre de ce projet de recherche. Cela implique une approche intégrée qui requiert l'utilisation conjointe d'outils chimiques et biologiques sélectionnés, tel que préconisé par le NRC (2003). Dans ces circonstances, le terme biodisponibilité représentera désormais la fraction d'une substance présente dans le milieu qui exercera un effet dans un organisme donné. Cette définition se rapporte à la notion de « toxicologiquement biodisponible », telle que spécifiée par Dickson *et al.* (1994) et décrite dans Lanno *et al.*

(2004). D'autres termes utiles sont employés en matière de biodisponibilité et ces termes peuvent aussi avoir plusieurs sens. Ainsi, bioaccessibilité désigne habituellement la fraction d'un composé qui est libérée de sa matrice lors de la digestion et qui est donc disponible pour absorption (NRC, 2003; Peijnenburg et Jager, 2003). Toutefois, une autre définition basée sur le sens commun du mot « accessible » a récemment été proposée par Semple *et al.* (2004). Ces derniers définissent bioaccessible comme « disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un organisme depuis son environnement, si l'organisme a accès à la substance ». Cette définition implique une notion de laps de temps et la bioaccessibilité correspondrait alors à une sorte de « maximum potentiellement biodisponible ». Cette acception se rapproche de celle pour laquelle nous avons opté. Pour les fins des travaux de recherche rapportés ici, la bioaccessibilité sera considérée comme la portion d'un produit chimique qui peut être mobilisée par un organisme dans une matrice donnée. Ce réservoir équivaut à ce qui serait « environnementalement disponible » selon Dickson *et al.* (1994) et Lanno *et al.* (2004).

1.1.2 Biodisponibilité et sols

Les sols sont des écosystèmes beaucoup plus hétérogènes et complexes que les sédiments ou les milieux aquatiques (Alloway, 1995; Svendsen *et al.*, 2002; Tomson *et al.*, 2003). Ils constituent un ensemble d'habitats diversifiés et présentent souvent une évolution temporelle (NRC, 2003). Un sol, en tant qu'écosystème, est un assemblage d'un substrat minéral et d'un biota qu'il abrite. Il s'agit donc de bien plus qu'une simple matrice inerte tel que les sols sont communément perçus en raison de leur moindre « noblesse environnementale » et leur valeur émotionnelle auprès du public en comparaison aux milieux aquatiques. Pourtant, les sols ont des fonctions fondamentales au niveau écologique, géochimique et économique pour les sociétés humaines (Nason *et al.*, 2003). Or, les sols reçoivent de nombreux polluants parmi lesquels figurent en première ligne les pesticides et les métaux (souvent eux-mêmes inclus dans la formulation des pesticides). A titre d'illustration, le tableau 1.1 présente une estimation des émissions globales de divers métaux envers les sols pour les années 1980 (il n'existe malheureusement pas de données plus récentes à l'échelle mondiale). Les données

consignées dans ce tableau témoignent de l'ampleur de la contamination déjà à cette période et, malgré une éventuelle diminution des émissions dans les pays développés, les apports de polluants vers les sols ont assurément augmenté depuis au niveau global dû au développement des pays émergents.

Cette contamination croissante des sols pose des défis en termes d'évaluation des risques écotoxicologiques et écologiques ainsi que de gestion des sites contaminés (rémediation/restauration). Les critères réglementaires d'évaluation et de gestion des sols sont encore aujourd'hui majoritairement basés sur les concentrations totales des contaminants dans les sols (Peijnenburg *et al.*, 1997). Mais, on admet maintenant généralement que des teneurs élevées en toxiques dans un sol n'impliquent pas nécessairement un effet délétère et par conséquent un risque pour les récepteurs écologiques ou l'écosystème (Lanno *et al.*, 2003; NRC, 2003; Peijnenburg et Jager, 2003). Il en résulte que les critères de qualité établis sont dans la plupart des cas trop conservateurs et peu pertinents (Allen, 2002).

Tableau 1.1. Émissions mondiales de métaux traces vers le sol
Extrait de Nriagu et Pacyna (1988)

Métal	Émissions totales vers le sol
	(10^3 t.an^{-1})
As	64 – 132
Cd	9.9 – 45
Cu	1198 – 2944
Hg	2.2 – 18
Mo	35 – 168
Ni	160 – 673
Pb	808 – 1893
Sb	29 – 87
Se	6.4 – 77
V	48 – 242
Zn	1193 – 3294

Ils surestiment le risque effectif puisqu'un composé ne sera jamais entièrement disponible (Conder et Lanno, 2000). Dans cette situation, la connaissance de la biodisponibilité des contaminants dans les sols, encore trop souvent négligée, est essentielle (Fent, 2004). Une meilleure compréhension de ce facteur-clé est nécessaire car elle permettrait une gestion plus efficace des sols contaminés, entre autres en réduisant les coûts de gestion et de réhabilitation éventuelle (Ehlers et Luty, 2003; Bradham *et al.*, 2006).

La biodisponibilité dans les sols est un phénomène complexe qui englobe un ensemble de processus chimiques et biologiques. Lors de la phase initiale d'interaction entre le contaminant et le sol pendant laquelle s'établit un équilibre dynamique entre les différents réservoirs de contaminant, plusieurs réactions avec diverses composantes du sol se produisent. Les types d'interaction pouvant avoir lieu entre un contaminant et un sol sont l'association, la rétention, la sorption (ces phénomènes incluant l'absorption et l'adsorption) et la précipitation (NRC, 2003). Ces processus sont les effecteurs de la partition d'un composé entre les composantes du sol. Les éléments intervenant dans les interactions entre le sol et un polluant comprennent la nature des particules qui forment le sol (communément répertoriées en sable, silice et argiles), la matière organique (dont divers matériaux carbonés tels les acides humiques et fulviques) et les oxydes métalliques (Al, Fe et Mn) (NRC, 2003; Tomson *et al.*, 2003). Plusieurs variables physico-chimiques des sols permettent de rendre compte des interactions entre sol et contaminant ainsi que de caractériser le type de sol. Ces grandeurs sont le pH du sol, la granulométrie, la capacité d'échange cationique (CEC) ainsi que les teneurs en matière organique et en oxydes métalliques (Alloway, 1995). La description complète du rôle des différentes composantes du sol et de l'influence des paramètres physico-chimiques représentatifs relève de la chimie de l'environnement et dépasserait le cadre de la présente thèse. Les phénomènes à l'œuvre ont été bien documentés dans les multiples études portant sur ces sujets (Alloway, 1995; Sauvé, 2002; Tomson *et al.*, 2003). Le tableau 1.2 résume toutefois les principaux aspects de l'incidence de la composition du sol et des propriétés qui en découlent sur l'interaction des contaminants avec le sol. Ce tableau montre que les effets varient selon la classe du toxique (*e.g.* organique ou inorganique) et que le biota peut influencer sur la répartition de celui-ci entre les diverses phases du sol. D'ailleurs, des travaux récents ont mis en évidence que les vers de terre influencent la

compartimentation et la mobilité/disponibilité de nombreux métaux dans différents sols (Cheng et Wong, 2002; Ma *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2004, 2006; Zorn *et al.*, 2005a, b; Udovic *et al.*, 2007; Udovic et Lestan, 2007). L'ensemble de ces interactions biota-sol-polluant conditionne ainsi la partition de la substance entre les phases du sol et détermine la fraction du contaminant qui est théoriquement « environnementalement disponible » selon Lanno *et al.* (2004) ou bioaccessible selon notre définition. Mais, il faut aussi préciser que la ségrégation d'un contaminant dans un sol est un équilibre dynamique qui varie temporellement et avec l'hétérogénéité spatiale du sol (Alloway, 1995; Tomson *et al.*, 2003; Lanno *et al.*, 2004).

Pour atteindre les récepteurs biologiques, le composé toxique doit ensuite être transporté s'il ne s'en trouve pas à proximité. Il existe différentes modalités de transport pour un contaminant dans les systèmes environnementaux, en particulier les sols. Ainsi, le contaminant peut être transporté avec la particule de sol à laquelle il est associé (transport particulaire) ou il peut être relargué depuis cette particule dans la phase aqueuse du sol (eau interstitielle) ou dans une phase gazeuse (gaz dans le sol ou air) et être transporté dans ces fluides (NRC, 2003). La voie de transport adoptée dépend de la localisation initiale

Tableau 1.2. Propriétés du sol déterminantes pour la compréhension des interactions contaminant-sol.
Tiré de Tomson *et al.* (2003) et traduit en français

Paramètre	Importance
Composés chimiques organiques	
<i>Importance primaire</i>	
Contenu en carbone organique (f_{oc})	Contrôle l'étendue de la sorption (particulièrement si $f_{oc} \geq 0.1\%$ en masse)
Contenu en argile ou superficie de la surface des minéraux	Peut contrôler l'étendue de la sorption (surtout si $f_{oc} < 0.1\%$)
Température	Effet sur le taux et l'étendue de la sorption et de la désorption
Humidité	Contrôle le mécanisme et l'étendue de la sorption en phase gazeuse
<i>Importance secondaire</i>	
Caractéristiques du carbone organique	Inclut la nature aromatique ou aliphatique, la polarité, le contenu en noir de carbone naturel ou suie (issue des feux de forêts); aura un effet sur l'étendue de la sorption
Co-solutés en phase aqueuse, matière organique dissoute ou particules en suspension	Leur présence pourrait diminuer l'étendue de la sorption dans le sol
Présence de biota	Susceptible d'affecter l'ampleur de la sorption ou de la désorption apparente et la réactivité potentielle
Composés chimiques inorganiques	
<i>Importance primaire</i>	
pH du sol	Contrôle beaucoup de réactions de spéciation et de précipitation
Potentiel redox	Contrôle les réactions d'oxydoréduction
Capacité d'échange cationique	Contrôle l'étendue de la sorption par échange d'ions
Température	Effet sur le niveau et l'étendue de la sorption et de la désorption
Présence de composantes clés du sol : matière organique, oxydes de fer et de manganèse	Contrôle la nature et l'ampleur de la sorption
Chimie de l'eau interstitielle (e.g., présence de ligands complexants comme le carbonate, le sulfide et le phosphate)	Contrôle l'étendue de la complexation et de la précipitation
<i>Importance secondaire</i>	
Présence de biota	Peut affecter l'étendue de la sorption

du toxique, de ses propriétés physico-chimiques et de paramètres environnementaux (*i.e.* les propriétés de la matrice). Il existe trois voies majeures de transport des contaminants en phase solide : l'entraînement des particules de sol dans l'air, la suspension dans l'eau interstitielle et le mouvement colloïdal dans l'eau souterraine (NRC, 2003). Notre compréhension des processus de transport particulaire n'est cependant pas aussi avancée que celle des voies de transport en phase fluide, pour lesquelles nous disposons de plusieurs modèles (Charbeneau *et al.*, 2003). Durant la séquence de transport, les contaminants peuvent aussi subir des transformations par le biais de diverses réactions chimiques et biochimiques qui sont susceptibles d'affecter la biodisponibilité et la toxicité de ces composés toxiques de façon substantielle. L'ensemble de ces phénomènes se rapportant au transport des contaminants peut donc jouer un rôle important dans l'établissement du niveau de disponibilité desdits contaminants pour les organismes-cibles et ils devraient être mieux étudiés.

Lorsque le toxique se retrouve à portée du récepteur biologique, il peut entrer en contact et pénétrer dans ce dernier à travers une membrane physiologique. Les modalités du processus de contact et d'entrée dans l'organisme dépendent du type de récepteur (*e.g.* microorganisme, plante, invertébré, vertébré) et de la voie de contact (Allen, 2002; NRC, 2003). Aussi, il n'est pas vraiment possible de généraliser ce phénomène. On peut néanmoins représenter les mécanismes de façon conceptuelle et décrire comment la physiologie d'un organisme et le mode de contact avec la substance peuvent influencer le degré de contact et de pénétration dans l'organisme. Il existe donc plusieurs voies de contact-absorption selon le récepteur visé. Si le contaminant atteint directement la membrane cellulaire, comme c'est le cas pour les microorganismes, il devra passer à travers cette barrière. Il y a quatre mécanismes fondamentaux bien connus en biologie cellulaire au moyen desquels les toxiques peuvent franchir les membranes biologiques : la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif et l'internalisation par endocytose ou pinocytose (Raven *et al.*, 2005). Lorsqu'il s'agit d'un animal, trois modes d'absorption correspondant aux voies d'exposition directe aux produits chimiques (ingestion, contact cutané, inhalation) sont possibles : l'absorption à travers la muqueuse digestive, l'absorption à travers la muqueuse respiratoire et l'entrée via le tégument. Étant donné que la voie respiratoire n'est pas un canal d'entrée pertinent chez la plupart des organismes du sol ou du sédiment, les modes d'absorption effectifs deviennent

alors : la voie tégumentaire (à partir de l'eau interstitielle) ou la voie digestive soit depuis la nourriture soit par l'ingestion de sol (Sijm *et al.*, 2000). L'importance relative de chacune de ces voies dépend du type d'organisme. Pour la faune du sol qui est principalement composée d'invertébrés, l'absorption des contaminants est conditionnée par les caractéristiques physiques de l'animal (corps mou versus corps rigide) et la physiologie du tractus digestif. Ainsi, il a été établi que les organismes à corps mou tels que les vers de terre et certaines larves d'insectes sont principalement exposés via l'eau interstitielle tandis que les animaux recouverts d'une carapace ou une cuticule rigide comme les formes adultes de nombreux insectes et crustacés sont davantage exposés par le biais de la nourriture et l'ingestion de particules de sol (Belfroid *et al.*, 1995a, 1996; Saxe *et al.*, 2001; Peijnenburg, 2002; Jager *et al.*, 2003; Vijver *et al.*, 2003; Scott-Fordsmand *et al.*, 2004). Enfin, les plantes peuvent également capter les polluants présents dans les sols. Pour celles-ci, le mode d'exposition prédominant est par l'intermédiaire des racines. Les contaminants accèdent aux racines via le flux de transpiration, le transport par diffusion et le transport facilité par les microbes (NRC, 2003). Une fois à la surface de la racine, les substances toxiques solubles sont en mesure de pénétrer dans le tissu racinaire par l'intermédiaire du flux de transpiration ou au moyen d'une série de mécanismes conçus pour favoriser la captation des éléments nutritifs. Habituellement, on estime que seules les espèces ioniques libres et non complexées peuvent être absorbées par les racines (Chojnacka *et al.*, 2005; Rieuwerts *et al.*, 2006; Menzies *et al.*, 2007). Toutefois, des concentrations élevées de complexes métalliques ioniques ou organiques ont aussi été corrélées avec une absorption accrue. Les mécanismes d'absorption de ces micro-polluants complexés ne sont pas entièrement élucidés mais cela nécessite assurément la dissociation du composé de la phase solide (NRC, 2003). Les processus d'absorption des contaminants organiques sont moins bien connus que ceux des métaux mais, là encore, la solubilité (que ce soit en milieu aqueux ou lipidique) est un facteur prépondérant.

Quand la substance toxique se retrouve dans l'organisme, elle est susceptible d'induire des effets biologiques. Bien que certains produits chimiques comme les agents corrosifs puissent léser un organisme par contact direct, la majorité des toxiques exercent leurs effets au sein de l'organisme. Les xénobiotiques interagissent avec un ou plusieurs constituants

cellulaires, ce qui va altérer les fonctions biologiques. Du fait que le sol n'est plus directement impliqué à ce stade, l'accumulation du toxique et ses effets subséquents ne sont pas considérés par certains comme des processus de biodisponibilité en tant que tels (NRC, 2003). Or, ces phénomènes sont influencés par les processus précédents et constituent donc des indicateurs de biodisponibilité qui sont souvent évalués. De plus, les effets biologiques sont de plus en plus une préoccupation majeure pour les décideurs et les gestionnaires. C'est pourquoi nous considérons que le comportement du xénobiotique à l'intérieur de l'organisme fait partie intégrante de la séquence qui détermine la biodisponibilité, d'autant plus qu'il s'agit là d'éléments-clés lorsqu'on appréhende la biodisponibilité d'un point de vue toxicologique. Le sort d'un contaminant à partir du moment où il entre dans l'organisme peut s'avérer complexe et dépend du type de contaminant et du récepteur biologique. Par ailleurs, la forme et la concentration du toxique au site d'action biologique déterminent en partie l'amplitude et la nature de l'effet d'où l'importance des spécificités physiologiques de l'organisme-cible. La gamme d'effets possibles s'étend donc de l'absence d'effet à la létalité en passant par des symptômes sous-létaux comme une activité métabolique réduite, une reproduction altérée ou une sensibilité accrue aux stress physiques et chimiques imposés par l'environnement. Même s'il n'est pas possible de dégager des généralités concernant les effets précis d'un contaminant sur le biota, il existe un certain nombre de traitements génériques qu'un composé toxique peut subir dans l'organisme. Ainsi, le composé peut être accumulé, distribué ou inactivé par séquestration dans l'organisme. Le contaminant peut aussi être métabolisé, biotransformé et éventuellement excrété (Lanno *et al.*, 2003; NRC, 2003; Lanno *et al.*, 2004). Tous ces mécanismes sont susceptibles de modifier à nouveau la fraction du contaminant disponible au site d'action biologique (ou biodisponibilité toxicologique du contaminant), qui est la variable qui ultimement nous intéresse. Lorsque ladite fraction du produit a réagi avec les cibles désignées dans l'organisme, diverses répercussions s'ensuivent pour l'individu mais surtout, ces effets peuvent se transmettre à travers les différents niveaux d'organisation biologiques et écologiques tel qu'illustré par la figure 1.2. C'est le concept de la cascade hiérarchique de réponse biologique au stress qui est un paradigme central en écotoxicologie (Spurgeon *et al.*, 2005). Même si la cascade hiérarchique effective de réponse biologique à la contamination obtenue par Spurgeon *et al.* (2005) pour le ver *L. rubellus* est très semblable à la figure 1.2, il convient toutefois de

préciser que celle-ci ne constitue le plus souvent qu'un diagramme conceptuel de cette cascade. En effet, la réalité des interactions entre les contaminants et les systèmes biologiques ainsi qu'entre ces systèmes rend habituellement cette cascade plus complexe et beaucoup moins linéaire, tel qu'illustré dans Svendsen *et al.* (2002). Il faut également mentionner que les formes sous lesquelles se retrouve la substance toxique dans l'organisme (*i.e.* différentes formes de stockage) peuvent influencer le transfert du contaminant et la transmission des effets associés le long de la cascade, notamment dans les réseaux trophiques (Edwards et Bohlen, 1992; Reinecke *et al.*, 2000). Cette présentation conceptuelle de la biodisponibilité illustre son importance à tous les niveaux de l'évaluation des risques écotoxicologiques et pour la gestion des sites contaminés.

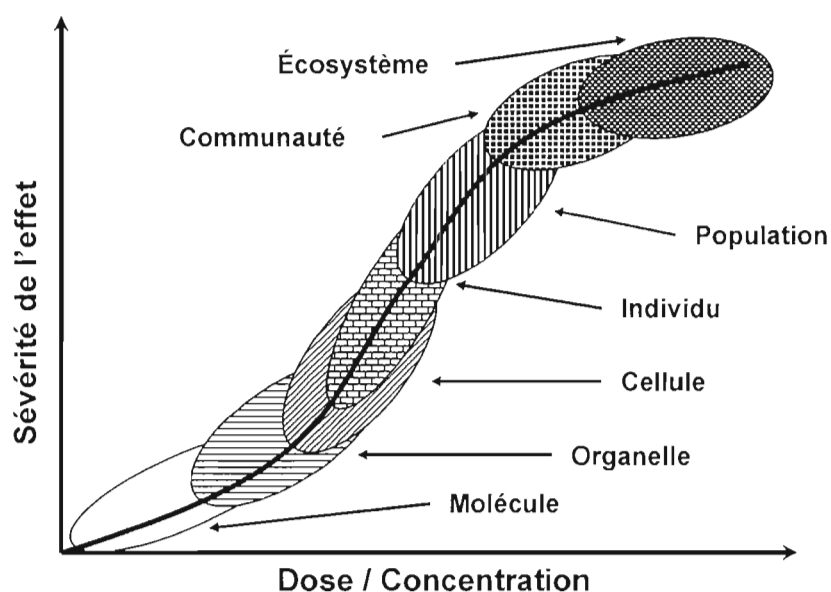


Figure 1.2. Diagramme schématisant la relation hiérarchique entre les réponses écotoxicologiques mesurées à différents niveaux d'organisation biologique. Extrait de Spurgeon *et al.* (2005) et traduit en français.

I.1.3 Niveau actuel de l'intégration de la biodisponibilité dans le cadre réglementaire et la gestion des sols contaminés

À ce jour, les réglementations fixant les seuils de référence et les critères de qualité des sols en ce qui a trait à la pollution sont encore basés sur les concentrations totales des contaminants, ce qui est dans de nombreux cas beaucoup trop conservateur et inapproprié en termes d'efforts techniques et financiers (Peijnenburg *et al.*, 1997; Alexander, 2000; Menzie *et al.*, 2003; Bradham *et al.*, 2006). Pour le moment, il n'y a pas de reconnaissance légale de la notion de biodisponibilité en matière de décontamination de sol tandis que cette notion est émergente dans le cadre de la gestion des sédiments et c'est un principe plus amplement adopté dans la gestion et l'élimination des biosolides (NRC, 2003). Le problème vient du fait qu'il n'existe pas de cadre, ni de directive réglementaire, ni de consensus scientifique en ce qui concerne le niveau et les éléments de preuve requis pour une évaluation exhaustive du processus de biodisponibilité. En réalité, les concepts reliés à la biodisponibilité n'ont pas encore reçu une large adhésion des législateurs et du public car ils sont parfois perçus comme des approches pour un statut quo ou pour en faire moins (Ehlers et Luty, 2003). Pourtant, les facteurs qui conditionnent la biodisponibilité font partie intégrante du cadre de détermination des risques pour la santé humaine et les écosystèmes, ne serait-ce qu'au niveau de l'exposition (MEFQ, 1998). De ce fait, la biodisponibilité ne doit pas être perçue comme un élément nouveau qui est en dehors des démarches standard fondées sur le risque et utilisées pour la gestion de l'environnement. L'objectif de l'analyse de biodisponibilité dans ce contexte est de réduire l'incertitude dans les estimations de l'exposition et ainsi augmenter la précision de l'évaluation de risque (Menzie *et al.*, 2003). Bien que la prise en compte des mécanismes de biodisponibilité soit inhérente à l'évaluation de risque, seuls certains des processus pertinents sont généralement considérés explicitement alors que les conjectures émises à propos des autres processus ne sont souvent pas transparentes. Aussi, la tendance à standardiser les procédures réglementaires d'évaluation des risques a conduit à utiliser certaines valeurs par défaut dont on présume qu'elles ont une large applicabilité pour de multiples sites. Mais, cela a suscité la fausse idée que ces valeurs par défaut représentant les processus de biodisponibilité dans l'évaluation de risque sont conservatrices et adéquates en toutes circonstances (Ehlers et Luty, 2003). En effet, les questions de biodisponibilité sont presque toujours spécifiques à chaque site. Il s'avère donc plus réaliste de réunir des données

propres à chaque site examiné. Un point intéressant est que la prise en compte explicite des aspects de la biodisponibilité est plus répandue dans l'évaluation des risques écologiques que dans l'appréciation des risques pour la santé humaine (Ehlers et Luty, 2003). Cela provient du fait qu'il est plus acceptable d'un point de vue logistique et éthique d'effectuer des analyses sur des récepteurs écologiques que sur des humains et que les gestionnaires ont une façon différente de traiter l'incertitude en évaluation des risques écologiques (NRC, 2003). D'autre part, les ajustements des estimations d'exposition chez les récepteurs humains reposent souvent sur des éléments plus robustes que pour les récepteurs écologiques.

Le nombre d'exemples où les processus de biodisponibilité ont été incorporés dans l'évaluation de risque de sols contaminés est limité. C'est le cas notamment pour les sites de Baird et McGuire, Holbrook, MA; Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN et Rocky Mountain Arsenal, Denver, CO (NRC, 2003). Pour les deux premiers sites, l'évaluation des risques causés par la contamination portait sur les invertébrés et la macrofaune tandis que pour le dernier site, seule la macrofaune a été considérée. Une appréciation de la biodisponibilité a été intégrée de manière implicite via l'établissement de modèles de bioaccumulation et de transfert dans la chaîne trophique assortis de mesures prises *in situ*. Cette intégration limitée de la biodisponibilité dans les procédures d'évaluation des risques pour les sols contaminés provient en partie du manque de compréhension et de description des mécanismes lors de ladite procédure. Cela empêche le développement de modèles d'exposition techniquement robustes, particulièrement ceux qui pourraient incorporer les fluctuations temporelles des facteurs physiques, chimiques et biologiques. En effet, si les outils et modèles stochastiques sont utiles pour nous renseigner sur les mécanismes déterminant la biodisponibilité, un effort notable pour générer des outils ou des modèles mécanistiques est essentiel pour le futur développement d'outils d'évaluation de la biodisponibilité (Ehlers et Luty, 2003; NRC, 2003). Dans ce domaine, les sols sont plutôt mal servis et il reste beaucoup à faire, même en matière de caractérisation empirique.

I.2 Le ver de terre : une sentinelle significative et pertinente pour les sols

I.2.1 Présentation de l'organisme et intérêt en écotoxicologie

Les vers de terre, également appelés lombrics, appartiennent à la classe des Oligochètes dans le phylum des Annélides (Edwards et Bohlen, 1996). Ils constituent le groupe d'invertébrés le plus important dans la plupart des sols à travers le monde, en terme de biomasse (de 60 à 80% de la biomasse animale) comme de dynamique (Lavelle, 1983; Lee, 1985; Edwards et Bohlen, 1992; Kammenga *et al.*, 2000; Römcke *et al.*, 2005). Leur signification écologique est donc considérable. De par leur abondance, les vers de terre jouent un rôle important dans la chaîne alimentaire car ils sont une nourriture de choix pour de nombreux prédateurs, leur fournissant ainsi un apport protéique substantiel (Ireland, 1983; Cooke *et al.*, 1992; Edwards et Bohlen, 1996; Efronson *et al.*, 1997). Ces organismes assurent aussi des activités essentielles pour le bon fonctionnement et la bonne qualité de leur habitat. En effet, ils ont la capacité de modifier leur environnement et même de créer de nouveaux habitats par le biais de diverses actions (Edwards et Bohlen, 1996; Römcke *et al.*, 2005). Cette faculté leur a même valu le titre d'« ingénieurs des écosystèmes » (Jones *et al.*, 1994). Les vers de terre peuvent notamment :

- pénétrer le sol en construisant des galeries ainsi qu'en augmentant la taille des pores;
- acheminer les particules de sol et la matière organique par leurs déjections;
- fragmenter les matériaux organiques comme première étape de la décomposition de la matière organique;
- fournir des éléments nutritifs aux plantes (par exemple, en les concentrant dans les parois des galeries ou en accroissant la disponibilité des nutriments tels que le phosphore);
- déplacer des graines au sein du profil pédologique;

- changer la diversité et stimuler l'activité de la communauté microbienne par une alimentation sélective et en produisant des fèces riches en substances nutritives.

Ces activités améliorent la structure du sol, favorisent l'infiltration de l'eau dans le sol (ce qui a souvent pour effet la formation d'une strate humique près de la surface du sol dans les écosystèmes forestiers principalement) et une élévation de la productivité dans les prés et les vergers. De cette manière, les vers de terre augmentent la fertilité des sols. Il a également été montré que l'action des vers de terre (y compris le ver de compost *Eisenia fetida*) entraîne la formation d'agrégats de sol hydrodynamiquement stables, réduisant ainsi l'érosion des sols (Edwards et Bohlen, 1996; Römcke et al., 2005; Sanchez-Hernandez, 2006). Les comportements mentionnés ci-dessus se manifestent à divers degrés chez les différentes espèces de ver, selon leurs caractéristiques écologiques. Les vers de terre se répartissent en trois groupes écologiques (Edwards et Bohlen, 1996; Römcke et al., 2005) : les épigés (ou inhibiteurs de litière) dont font notamment partie *Eisenia fetida* et *E. andrei*, les anéciques (ou constructeurs de galeries verticales) dont *Lumbricus terrestris* fait partie et les endogés (ou résidents de la couche minérale). L'ensemble des attributs et des fonctions écologiques des vers de terre indiquées ci-dessus confèrent à de nombreuses espèces le statut d'« espèce-clé » pour les écosystèmes pédologiques. De plus, les vers de terre ont des interactions étroites avec les micro-organismes et à ce titre, la communauté ver-microbe a aussi été qualifiée d'« association-clé » (Römcke et al., 2005).

Dans une perspective écotoxicologique, le profil éco-physiologique des vers de terre en a fait des bioindicateurs de choix de la pollution des sols (Edwards et Bohlen, 1992, 1996; Cortet et al., 1999; Ribera et Saint-Denis, 1999; Lanno et al., 2004; Sanchez-Hernandez, 2006). En effet, ces organismes sont en contact direct et permanent avec le sol, contrairement à de nombreux vertébrés qui sont exposés par l'intermédiaire de la chaîne trophique (Kammenga et al., 2000; Sanchez-Hernandez, 2006). Comme les vers absorbent des quantités conséquentes de sol, ils sont exposés aux contaminants par leurs surfaces d'assimilation alimentaire mais il a été démontré que la voie tégumentaire est un mode d'exposition prépondérant (Belfroid et al., 1996; Saxe et al., 2001; Peijnenburg, 2002; Jager et al., 2003; Vijver et al., 2003; Scott-Fordsmand et al., 2004). La surface externe de leur épiderme est

vascularisée mais dépourvue de cuticule, ce qui favorise une entrée directe des contaminants présents dans le milieu. L'aptitude des vers à bioaccumuler et à bioconcentrer les produits toxiques est bien documentée (Hopkin, 1989; Nahmani *et al.*, 2007). Les polluants ainsi internalisés peuvent alors atteindre les niveaux trophiques supérieurs via la chaîne alimentaire (Cooke *et al.*, 1992; Edwards et Bohlen, 1992; Reinecke *et al.*, 2000). Enfin, l'existence d'un volume de connaissances substantiel au sujet de leur écologie, leur physiologie et leur écotoxicologie est un motif supplémentaire qui fait des vers de bons bioindicateurs. Plusieurs protocoles standardisés de tests de toxicité avec les vers de terre ont d'ailleurs été élaborés et peuvent être utilisés de façon routinière pour déterminer les effets toxiques de sols contaminés (OCDE, 1984; Abdul-Rida et Bouché, 1997; ISO, 1998; Ribera et Saint-Denis, 1999).

I.2.2 L'organisme à l'étude : le ver Eisenia andrei

L'espèce *Eisenia andrei* (figure 1.3), souvent appelée ver de compost, constitue un bon modèle pour l'étude de la toxicité des contaminants dans le sol, bien qu'elle ne soit pas très représentative de la biomasse lombricienne naturelle (Bouché, 1992; Cortet *et al.*, 1999; Ribera et Saint-Denis, 1999). D'ailleurs, plusieurs organismes de réglementation et de protection de l'environnement nationaux et internationaux ont opté pour ce ver comme bioindicateur des écosystèmes terrestres et, dans le but d'élucider la toxicité aiguë et chronique des polluants en sol, des essais ont été normalisés avec cette espèce (OCDE, 1984; USEPA, 1989; ISO, 1998). De multiples arguments motivent ce choix. Tout d'abord, il y a la valeur et les fonctions écologiques de l'organisme tel qu'exposé précédemment. Ensuite, son mode de vie épigé (également décrit plus haut) rend *E. andrei* plus vulnérable aux prédateurs (ce qui en fait un vecteur de transfert des contaminants vers les niveaux trophiques supérieurs) et aux conditions climatiques défavorables. En outre, le court cycle de vie d' *E. andrei* (maturité atteinte en 7-8 semaines; figure 1.4) et sa fécondité élevée (2-5 cocons/ver/semaine engendrant 3 juvéniles/cocon en moyenne) permettent assez aisément d'étudier les effets de substances toxiques sur les spécimens adultes, la reproduction, de même que sur la seconde génération (Venter et Reinecke, 1988; Edwards et Bohlen, 1992; Efrogmson *et al.*, 1997). Le point intéressant qui en résulte est que ce ver peut facilement être

maintenu en culture dans un laboratoire sous des conditions contrôlées et, finalement, c'est une espèce qui tolère divers types de sol (Edwards et Bohlen, 1992; Efroymsen *et al.*, 1997; Lanno *et al.*, 2004).

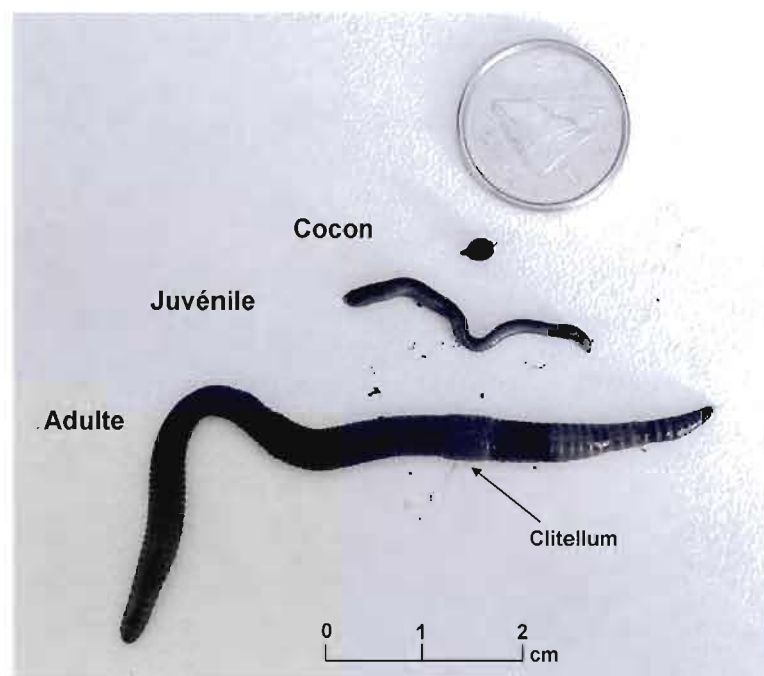


Figure 1.3. Le ver de terre *Eisenia andrei*.

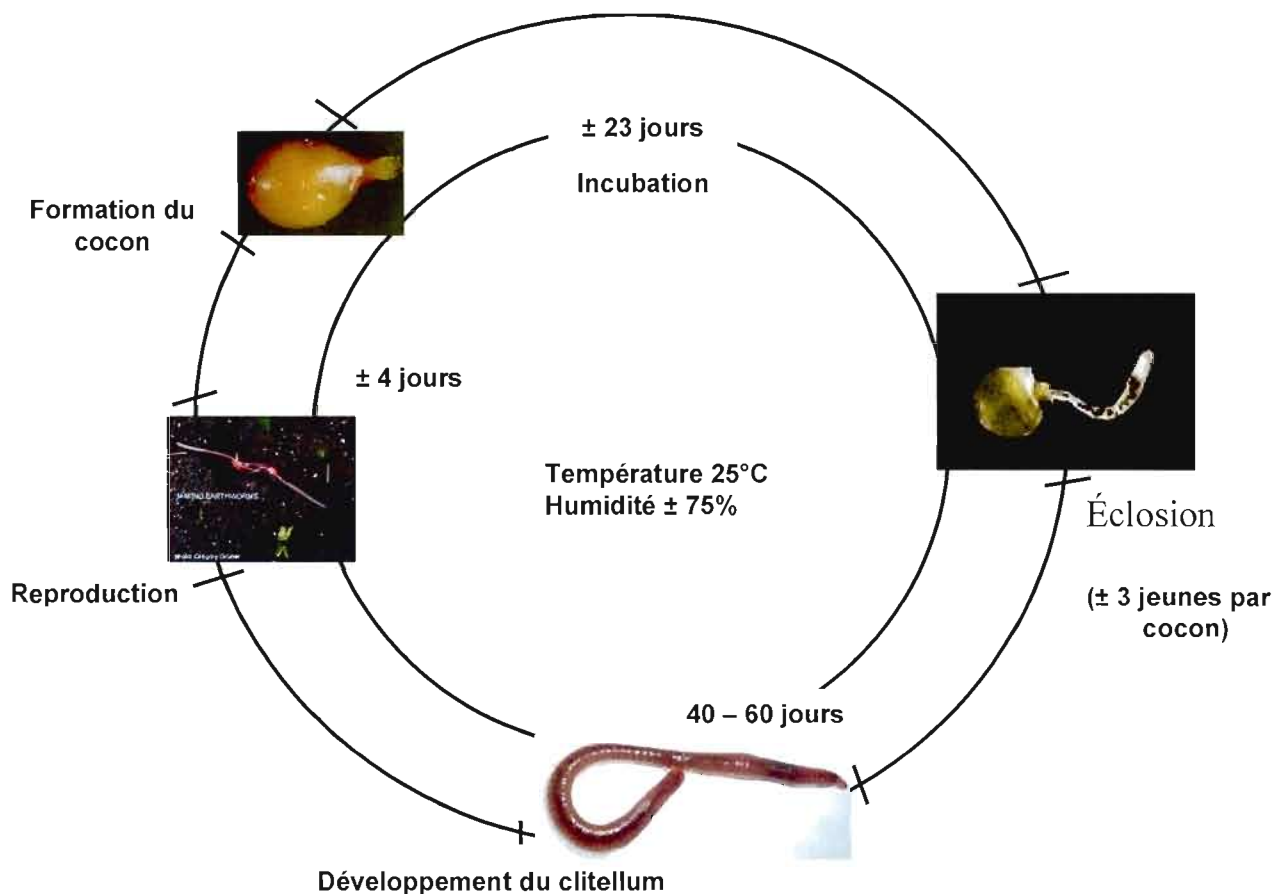


Figure 1.4. Diagramme du cycle de vie d'*Eisenia fetida andrei* élevé dans du fumier de vache à une température de 25°C et une humidité de 75%. Tiré de Venter et Reinecke (1988) et traduit en français.

1.2.3 La biodisponibilité des contaminants dans le sol et les vers de terre

L'incidence de la biodisponibilité des contaminants sur la toxicité de ceux-ci pour les vers de terre est un fait bien documenté (van Gestel et van Dis, 1988; van Gestel et Ma, 1988; Peijnenburg, 2002; Spurgeon et Hopkin, 1996; Lock et Janssen, 2001; Bradham *et al.*, 2006; Spurgeon *et al.*, 2006). En effet, les interactions du composé toxique avec les différentes composantes du sol déterminent l'importance de la fraction du contaminant potentiellement bioactive susceptible d'occasionner de la toxicité chez le ver de terre. C'est pourquoi les effets toxiques d'une même concentration de contaminant dans différents sols peuvent

s'échelonner de l'absence de lésion jusqu'à la létalité complète des individus (Lanno *et al.*, 2004). Tel que spécifié précédemment, les vers de terre sont susceptibles d'être exposés aux polluants du sol par l'intermédiaire du système digestif et par la voie cutanée. Or, plusieurs travaux ont mis en évidence la prévalence du mode d'absorption dermique (Belfroid *et al.*, 1995a, b; Jager *et al.*, 2003; Vijver *et al.*, 2003; Scott-Fordsmand *et al.*, 2004). Cette connaissance de la contribution relative de chacun des modes d'exposition favorise la sélection du ver de terre pour étudier la biodisponibilité des contaminants dans le sol. En plus du fait que le ver de terre est l'organisme conventionnel utilisé pour les tests de toxicité du sol, il existe maintes raisons valables d'utiliser le ver de terre comme organisme modèle pour évaluer la biodisponibilité de nombreuses substances toxiques dans les systèmes pédologiques (Lanno *et al.*, 2004) :

- les vers de terre demeurent dans le sol et sont plus ou moins en contact continu avec l'une ou l'autre phase du sol (Kammenga *et al.*, 2000; Sanchez-Hernandez, 2006);
- on rencontre des vers de terre sur les sites contaminés, ce qui permet une validation de terrain de la biodisponibilité des polluants;
- les vers de terre se retrouvent dans une grande variété de types et d'horizons de sol (Edwards et Bohlen, 1996);
- ils absorbent les toxiques via le tégument, directement depuis le sol et par ingestion (Jager *et al.*, 2003; Vijver *et al.*, 2003; Scott-Fordsmand *et al.*, 2004);
- ce sont des animaux volumineux donc les teneurs en contaminants peuvent aisément être mesurées dans chaque spécimen;
- le niveau d'activité des oxydases à fonction mixte est limité, ce qui leur confère un potentiel plus élevé d'accumulation des composés organiques qui seraient normalement métabolisés chez d'autres organismes (Dhainaut et Scaps, 2001; Brown *et al.*, 2004);
- nous bénéficions d'une bonne compréhension de la physiologie et du métabolisme des métaux chez les vers de terre (Hopkin, 1989);
- des protocoles standardisés d'évaluation de la toxicité ont été développés;
- de multiples techniques sont disponibles pour déterminer les effets au niveau de la population, de l'organisme et en-deçà de l'individu chez les vers de terre;

- certaines espèces, comme *Eisenia fetida* ou *E. andrei*, peuvent facilement être élevées dans des conditions contrôlées en laboratoire et supportent différentes sortes de sols, permettant de les tester.

Finalement, comme cela a été précisé précédemment, nous disposons d'un solide socle de connaissances dans plusieurs domaines pertinents de la biologie des vers de terre. La figure 1.5 détaille le contexte de biodisponibilité auquel sont soumis les vers de terre dans le sol. Elle illustre également les différents « degrés de biodisponibilité ». D'un point de vue global, les mécanismes à l'œuvre sont les processus généraux de biodisponibilité décrits au début de cette section mais certains aspects sont spécifiques aux vers de terre (voie d'exposition cutanée prédominante, faible activité de biotransformation des xénobiotiques par les enzymes de phase I).

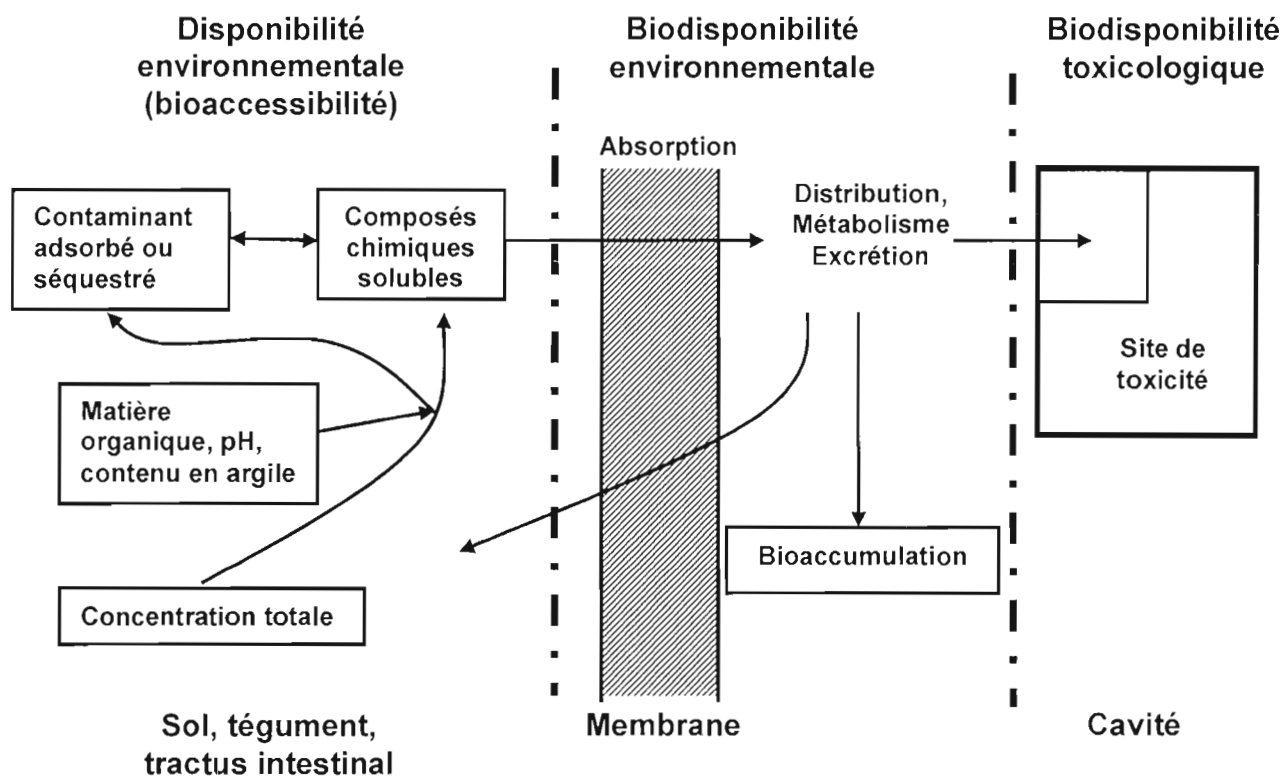


Figure 1.5. Modèle schématique de la biodisponibilité pour les vers de terre. Adapté de Lanno *et al.* (2004) et traduit en français.

I.2.4 Les outils d'évaluation de la biodisponibilité pour les vers de terre

Il existe différentes sortes d'outils pour appréhender la biodisponibilité, selon leur nature (chimique ou biologique) et le processus visé (NRC, 2003; Lanno *et al.*, 2004). Pendant longtemps et jusqu'à récemment, la biodisponibilité a été abordée sous un angle presque exclusivement chimique en raison de la préséance de cette discipline dans la réglementation environnementale (Dickson *et al.*, 1994). Néanmoins, il est maintenant bien accepté que les moyens biologiques d'évaluation de la biodisponibilité sont très pertinents car seul l'organisme-cible peut réellement déterminer la fraction des contaminants qui lui est biodisponible (Peijnenburg et Jager, 2003; Lanno *et al.*, 2004). Si les outils chimiques restent une approche utile et efficace, ils doivent être corrélés à une forme de mesure biologique pour être valables (Alexander *et al.*, 2003). Il existe quatre grandes catégories de mesure de biodisponibilité (Lanno *et al.*, 2004) : les mesures chimiques indirectes, les mesures chimiques directes (qui par définition, n'existent pas telles quelles), les mesures biologiques indirectes et les mesures biologiques directes. Les mesures chimiques indirectes de la biodisponibilité sont des teneurs de composé chimique déterminées dans le milieu d'exposition. Ces mesures incluent une variété de méthodes chimiques permettant d'analyser ces concentrations environnementales allant des teneurs totales à certaines mesures des concentrations des substances chimiques dans une solution de sol. Ces mesures chimiques indirectes de la biodisponibilité permettent d'estimer la portion du contaminant qui est « environnementalement disponible » (ou bioaccessible selon notre définition) et englobent divers traitements et analyses chimiques pratiqués sur le substrat (depuis de vigoureuses extractions destinées à obtenir le total jusqu'à différentes techniques d'extraction du composé présent dans différentes phases liquides ou solides du sol). Bien que les teneurs totales des contaminants soient encore utilisés dans l'élaboration de critères de qualité du sol, il est désormais bien établi que ces valeurs sont irréalistes et peu pertinentes pour ce qui est de la biodisponibilité et de la concentration effective d'exposition (Alexander, 2000; Conder et Lanno, 2000; Allen, 2002).

La fraction d'une substance chimique qui est effectivement biodisponible pour les vers de terre est supposée résider dans l'eau interstitielle (Houx et Aben, 1993; Belfroid *et al.*, 1996),

ce qui implique la partition de la substance entre les phases de sorption du sol et l'eau interstitielle avant son absorption par le ver de terre. Tel que mentionné précédemment, cette conjecture a été vérifiée par plusieurs études (Jager *et al.*, 2003; Vijver *et al.*, 2003). D'ailleurs, la concentration du toxique dans l'eau interstitielle s'est montrée mieux corrélée à la bioaccumulation ou aux effets sur les vers de terre que les teneurs totales dans plusieurs cas (Van Gestel et Ma, 1988, 1990; Belfroid *et al.*, 1994; Ragnvaldsson *et al.*, 2007). Cependant, il peut s'avérer difficile d'extraire l'eau interstitielle du sol; ainsi différents extraits aqueux (souvent additionnés d'un agent chimique plus ou moins agressif) peuvent être employés dans le but d'estimer les concentrations des contaminants dans l'eau interstitielle (Sauvé, 2002; Alexander *et al.*, 2003). Le type d'extractant utilisé dépend de la nature du contaminant, de la fraction que l'on cherche à extraire et donc aussi des objectifs de recherche (Gupta *et al.*, 1996). Pour ce qui est des métaux, une extraction aqueuse avec un sel neutre, qui est chimiquement plus pertinente qu'avec de l'eau pure car plus représentative des conditions du milieu (Sauvé, 2002), est souvent réalisée. Des études ont révélé que cette approche est plus correcte et plus réaliste que de se baser sur les concentrations totales dans le sol. Dans ce sens, Conder et Lanno (2000) ont démontré que la toxicité du Cd, Pb et Zn en sol amendé était nettement mieux corrélée avec les niveaux de ces métaux extractibles avec du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.1 M qu'avec les teneurs totales (extraites par digestion acide); ils ont aussi montré que l'analyse des résultats de toxicité (en terme de toxicité relative des métaux) à la lumière des concentrations obtenues dans l'extrait avec l'électrolyte faible différait de celle avec les teneurs totales. Ces observations ont également été confirmées par Conder *et al.* (2001) avec des sols contaminés en Pb et Zn suite à des opérations de forage et de fonderie et qu'ils ont traités avec différents types de biosolides. De plus, il est également bien établi que les concentrations mesurées dans des extraits aqueux de sol avec un sel neutre sont représentatives de la portion des contaminants qui est phytodisponible (NRC, 2003; Chojnacka *et al.*, 2005; Menzies *et al.*, 2007). D'autres agents d'extraction tels que des chélateurs comme l'EDTA ou le DTPA ou un acide faible comme l'acide acétique sont aussi utilisés dans différentes études (Dai *et al.*, 2004; Lukkari *et al.*, 2004a, b). Quant aux polluants organiques qui sont généralement non polaires, diverses techniques d'extraction employant le plus souvent un solvant organique doux, telles que l'extraction au Soxhlet, sont d'ordinaire adoptées. Les teneurs en substances organiques non polaires dans ce genre

d'extrait ont d'ailleurs été corrélées à la bioaccumulation desdites substances dans les vers de terre (Chung et Alexander, 1999; Tang et Alexander, 1999). Enfin, différents procédés d'extraction depuis la phase solide sont disponibles pour évaluer la fraction environnementalement disponible d'un contaminant dans un sol. La répartition du composé chimique à l'égard de ces dispositifs mis en contact avec du sol humide ou une suspension de sol pendant un certain laps de temps est présumée être proportionnelle à la concentration du composé chimique dans l'eau interstitielle. Des phases multiples et variées peuvent faire office de système d'extraction en phase solide (Lanno *et al.*, 2004). Ces dispositifs présentent l'avantage de pouvoir être déployés *in situ* avec un minimum d'altération physico-chimique du sol mais l'efficacité de ce type de technique dépend des caractéristiques du dispositif et de la classe du contaminant concerné (Tang et Alexander, 1999; Conder et Lanno, 2000; Conder *et al.*, 2001). Ainsi, Conder et Lanno (2000) et Conder *et al.* (2001) ont montré que les membranes échangeuses d'ions enduites de DTPA étaient moins performantes pour évaluer la biodisponibilité du Cd, du Pb et du Zn respectivement dans du sol artificiel amendé avec ces métaux et dans un sol pollué par des activités métallurgiques qu'une extraction avec un électrolyte faible. Les concentrations de métaux captées par les membranes étaient variables et peu corrélées à la toxicité chez *E. fetida*. Ces techniques paraissent prometteuses pour détecter les fractions des composés organiques et, dans certaines situations, des métaux qui sont environnementalement disponibles dans le sol. Toutefois, elles doivent préalablement faire la preuve d'une corrélation avec la bioaccumulation ou la toxicité des toxiques en question et avoir été validées sur le terrain afin d'être considérées comme d'authentiques outils de quantification de la biodisponibilité.

Il existe également des mesures biologiques de la biodisponibilité. Ainsi, les mesures directes de biodisponibilité consistent en des déterminations de la quantité effective d'un produit chimique absorbée par le ver de terre. Ces mesures sont susceptibles de fournir l'appréciation la plus exacte de la biodisponibilité puisqu'elles intègrent tous les facteurs de variation biotiques et abiotiques de la biodisponibilité d'un contaminant (Lanno *et al.*, 2004). Ce genre d'approche comprend des mesures telles que la bioaccumulation et les doses corporelles critiques ou « critical body residues » (CBR). La bioaccumulation, souvent représentée par des facteurs de bioaccumulation (FBA), est une mesure directe des

concentrations de contaminants présents dans le ver de terre résultant du flux entrant net de substances chimiques à partir du sol déterminé par la balance entre les processus d'absorption et de dépuration. Les CBR sont des concentrations internes de contaminant qui sont associées à des indicateurs sous-létaux ou létaux (McCarty et Mackay, 1993). La bioaccumulation se rapporte aux quantités de contaminant accumulées au site biologique où s'exerce l'action toxique mais en dessous du seuil de toxicité ainsi qu'aux résidus dans d'autres tissus ne renfermant pas de site d'induction de la toxicité (*i.e.* tissus lipidiques). Par contre, les CBR correspondent à des résidus de contaminant au site d'activité toxique à un niveau supérieur au seuil nécessaire pour provoquer un effet toxique et peuvent aussi inclure les résidus situés dans les tissus de stockage. Ces paramètres peuvent plus simplement être considérés comme un continuum de concentrations tissulaires de toxiques dans les vers de terre allant de l'absence d'altérations jusqu'à des degrés susceptibles d'entraîner des réponses au niveau de l'organisme comme une reproduction compromise ou la létalité. Dans cette optique, les CBR représenteraient la biodisponibilité toxicologique alors que la bioaccumulation constituerait un intermédiaire entre la biodisponibilité environnementale et la biodisponibilité toxicologique (cf. figure 1.5 plus haut). Il existe de nombreuses données sur l'accumulation des polluants chez le ver de terre, en particulier pour les métaux (Peijnenburg *et al.*, 1999; Nahmani *et al.*, 2007). Si le concept de « critical body residue » (CBR) est bien établi en écotoxicologie aquatique, l'application des CBR pour les organismes fouisseurs du sol ne s'est développée que récemment (Van Wensem *et al.*, 1994; Van Straalen, 1996). Des CBR ont été générés avec les vers de terre pour certains composés organiques ainsi que des métaux (Conder et Lanno, 2003; Lanno *et al.*, 2004). Ma (2005) a déterminé des CBR associés à la létalité et des effets sur la fécondité (diminution de la production de cocons) chez *L. rubellus* exposé à une gamme géométrique de concentrations de Cu dans deux sols naturels. Les concentrations tissulaires de Cu concordaient avec la fraction de Cu bioaccessible dans le sol. Les seuils obtenus ont été confrontés aux concentrations tissulaires en Cu mesurées chez des spécimens de cette espèce récoltés sur le terrain soit dans un sol d'un site sain soit d'un site pollué par des activités métallurgiques. Conder et Lanno (2003) ont également développé des CBR pour le Cd, le Pb, et le Zn individuellement et en mélange équitoxique avec *E. fetida* en sol artificiel ou dans des sols de terrain ayant subi un traitement de réhabilitation ou non. Ma (2005) de même que Conder et Lanno (2003) ont conclu que l'approche CBR semble être une

option intéressante pour l'évaluation de la qualité des sols en fonction de la biodisponibilité. Néanmoins, Conder et Lanno (2003) indiquent que l'utilisation de cet outil d'évaluation de la biodisponibilité est plus incertaine pour prédire des effets toxiques sous-létaux du fait de l'intervention de mécanismes physiologiques de détoxification qui peuvent moduler la concentration interne des contaminants. En outre, l'application des CBR à des sols de terrain comportant généralement une problématique de contamination multiple peut s'avérer assez compliquée en raison des interactions toxicologiques ou de la compétition pour les processus physiologiques qui peut se produire entre contaminants au niveau de l'organisme. Une autre limite de ces indicateurs est qu'ils sont restreints aux substances qui se bioaccumulent à des niveaux détectables. Par ailleurs, les modèles basés sur la bioaccumulation et les CBR posent souvent des hypothèses concernant la toxicocinétique des contaminants. Enfin, il peut s'avérer coûteux d'analyser certaines substances dans les tissus de ver de terre et cela peut même être ardu dans le cas d'une exposition à des composés inconnus ou qui ne sont normalement pas mesurés.

Les mesures de biodisponibilité peuvent aussi être strictement biologiques par nature et elles sont alors déterminées par la réponse du ver de terre à une exposition présumée à un contaminant. Les indicateurs de réponse qui correspondent à ce type de mesure et qui ont été étudiés chez les vers de terre constituent un éventail allant des paramètres de toxicité standards tels que la létalité jusqu'à des biomarqueurs signalant des effets sous-létaux. Dans cette perspective, les tests de toxicité et les biomarqueurs deviennent des moyens d'évaluation de la biodisponibilité (McMillen *et al.*, 2003; NRC, 2003; Peijnenburg et Jager, 2003). Sous réserve de l'utilisation de témoins adéquats, on peut effectivement affirmer que les indicateurs de toxicité et les biomarqueurs traduisent une réponse du ver de terre à un niveau donné de contaminant biodisponible. Pour ce qui est des biomarqueurs, ce postulat est étayé par plusieurs publications de synthèse sur les biomarqueurs chez les vers de terre ou sur la biodisponibilité dans les sols (Kammenga *et al.*, 2000; Scott-Fordsmand et Weeks, 2000; NRC, 2003; Sanchez-Hernandez, 2006). Cependant, la teneur réelle de contaminant biodisponible reste indéterminée. En dépit de cette inconnue, les indicateurs précités peuvent être qualifiés de mesures biologiques indirectes de biodisponibilité et couvrent un continuum allant de biomarqueurs biochimiques subcellulaires jusqu'à des réponses du niveau de

l'organisme entier comme les impacts sur la reproduction ou la mortalité (Lanno *et al.*, 2004). Dans cette situation, un toxique présent dans le sol sous la forme d'un gradient de concentrations biodisponibles peut être bien corrélé à une réponse biologique observée selon une relation de dose-réponse; cependant, la causalité n'en est alors pas pour autant établie, mais bien seulement supposée. Ces outils biologiques de mesure indirecte présentent en revanche l'avantage de fournir des indications quant aux interactions potentielles entre les contaminants dans un contexte réaliste d'exposition multiple (Ragnvaldsson *et al.*, 2007). Malgré l'existence de nombreuses méthodes d'évaluation des réponses au niveau de l'organisme (*e.g.* paramètres de la reproduction, biomarqueurs), aucune de ces mesures biologiques indirectes de la biodisponibilité ne permet réellement une détermination quantitative de la teneur de contaminant biodisponible à laquelle le ver a été exposé. D'autre part, nombre de ces mesures de biodisponibilité sont non spécifiques (paramètres de toxicité standard) même si certaines semblent plus spécifiques à des familles de polluants particulières (par exemple, les métallothionéines ou les oxydases à fonction mixte). En définitive, une approche intéressante et pertinente serait de coupler plusieurs types d'outils pour évaluer la biodisponibilité tels que des mesures chimiques indirectes avec des mesures biologiques indirectes et/ou directes.

Finalement, la dernière catégorie de mesure de biodisponibilité pour un ver serait théoriquement celle des mesures chimiques directes. Or, par définition, cela n'existe pas en tant que tel si on se base sur l'axiome que seul un ver de terre peut réellement déterminer quelle proportion du contaminant est biodisponible pour lui (McMillen *et al.*, 2003). En fait, ce type de mesure serait représenté par une valeur virtuelle qu'on estimerait au moyen de corrélations itératives entre une mesure chimique indirecte de biodisponibilité et une mesure biologique directe. Dès lors que cette corrélation aurait été réitérée suffisamment pour permettre la prédiction des effets biologiques sur la base de ces analyses chimiques, alors uniquement serait-il possible de qualifier ladite mesure chimique d'appréciation chimique directe de la biodisponibilité. Le meilleur prédicteur chimique de la biodisponibilité est théoriquement celui qui reflète le mieux la fraction « environnementalement biodisponible » d'un toxique dans le sol et qui est corrélé avec la meilleure estimation de la biodisponibilité toxicologique ou le nombre de moles du contaminant au site d'induction de la toxicité (Lanno

et al., 2004). En pratique, plusieurs méthodes chimiques existantes ainsi que les nouvelles méthodes destinées à quantifier la portion des composés chimiques qui est théoriquement biodisponible pour les vers de terre devront être validées à l'aide d'outils biologiques directs et indirects jusqu'à ce que des corrélations solides soient développées.

En somme, plusieurs éléments intéressants se dégagent de cette discussion sur les outils d'évaluation de la biodisponibilité. Ainsi, il ressort que l'application d'une panoplie d'outils est nécessaire pour la caractérisation des processus de biodisponibilité dans la mesure où aucun outil universel capable de décrire ou quantifier la biodisponibilité n'a été développé. En plus, les démarches dans ce sens ont jusqu'ici échoué (NRC, 2003). Par conséquent, une série d'outils complémentaires représentant différents processus de biodisponibilité est un choix plus judicieux que de multiples analyses concentrées sur une seule étape. Il est aussi important de bien comprendre le contexte environnemental pour lequel chaque outil sélectionné a été conçu afin d'éviter une utilisation incorrecte (NRC, 2003). Il faut également préciser qu'il n'est pas indispensable de comprendre et d'évaluer chaque mécanisme régissant la biodisponibilité pour obtenir des mesures exploitables pour fins d'application pratique. Une analyse appropriée de chaque cas doit permettre d'identifier les stades et les facteurs cruciaux. Enfin, une orientation ferme devrait être prise vers l'élaboration d'outils et de modèles mécanistiques de la biodisponibilité car cela est fondamental pour les progrès futurs dans la compréhension de cette variable majeure.

I.3 Les substances toxiques investiguées

I.3.1 Les matériaux énergétiques

Les composés énergétiques, également appelés matériaux énergétiques (ME) ou plus communément explosifs sont caractérisés par leur potentiel de détonation élevé. Lors d'une explosion, ces substances subissent une décomposition chimique qui génère des gaz comprimés comme produits ultimes (Akhavan, 1998). Ces derniers se dilatent et exercent alors une pression considérable quand la température augmente (Cooper, 1996). Il existe

différentes classes d'explosifs mais dans le cadre de cet exposé, nous nous intéresserons plus particulièrement aux composés nitro-organiques. En effet, ce sont ceux que l'on rencontre le plus fréquemment sur les terrains militaires (Talmage *et al.*, 1999; Pennington *et al.*, 2006). Parmi ces composés nitro-organiques, les trois principaux produits qui retiendront notre attention (et aussi les plus courants) sont le TNT (2,4,6-trinitrotoluène), le HMX (1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine) et le RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). Leur structure moléculaire est illustrée sur la figure 1.6. Dans le cas des composés nitro-organiques, les groupements nitro (NO_2) jouent le rôle d'oxydant tandis que le carbone et l'hydrogène font office de combustible lors de la détonation (Akhavan, 1998). Ces substances sont essentiellement utilisées pour des fins militaires (entraînement, conflits) et servent à la fabrication de différents dispositifs d'armement (bombes, missiles, grenades, mines) comme agents détonants et/ou de propulsion (Yinon, 1990; Card et Autenrieth, 1998). Cependant, les matériaux énergétiques ont quelques applications dans le secteur civil autres que pour la démolition, notamment pour le RDX qui est employé comme agent déclencheur des sacs gonflables dans les voitures (Chakraborty *et al.*, 2001). En pratique, la transformation des composés nitro-organiques en gaz est rarement complète et il en résulte que le composé parent ou les produits de réaction intermédiaires et finaux (incluant les métabolites) vont fréquemment se retrouver dans les sols. De ce fait, de multiples sites voués à des opérations militaires (manufacture des ME, entreposage des munitions, entraînement, destruction de l'armement défectueux ou obsolète) sont contaminés par ces substances de même que par leurs produits de synthèse et de dégradation (Yinon, 1990; Robidoux *et al.*, 2004a).

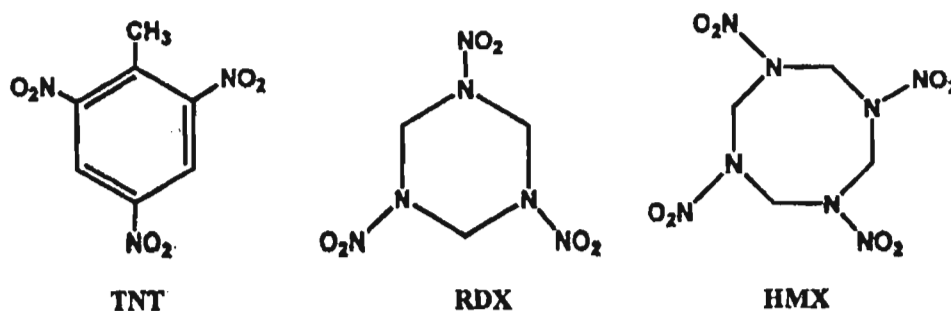


Figure 1.6. Structure moléculaire du TNT, du RDX et du HMX.

Le HMX

L'avènement de la Seconde Guerre mondiale a amené l'émergence et la fabrication à grande échelle de nouveaux explosifs tels que le RDX [Royal Demolition eXplosive] et le HMX [High Melting eXplosive] (Akhavan, 1998; Card et Autenrieth, 1998). Ces deux composés énergétiques sont synthétisés au moyen du processus de Bachmann qui a d'ailleurs été d'abord adopté au Canada durant le conflit de 1939-1945 (Epstein et Winkler, 1952; Yinon, 1990; Akhavan, 1998). Le processus de synthèse était initialement orienté vers la production de RDX et le HMX a alors été découvert comme produit secondaire de la réaction (6-10% des produits). Une modification au processus de Bachmann permet d'obtenir du HMX comme produit primaire (55-60%) et le RDX devient le produit secondaire (Yinon, 1990). Le HMX existe sous quatre formes polymorphiques : α , β , γ et δ (Card et Autenrieth, 1998). La forme β est la plus souhaitée car elle est la plus stable donc la moins sensible aux chocs et constitue ainsi le type requis pour les usages militaires. Le HMX possède un potentiel explosif plus élevé que celui du TNT (130%) en raison de son point de déflagration supérieur et de sa vitesse de détonation de 9100 m.s^{-1} (Cooper, 1996; Akhavan, 1998; Talmage *et al.*, 1999). Du fait de sa densité supérieure, le HMX est utilisé dans les situations où une énergie élevée et un plus petit volume sont nécessaires. Ainsi, le HMX est préférentiellement employé dans les explosifs binaires, les matériaux solides de propulsion des missiles, comme charge de détonation des obus d'artillerie ou pour faire imploser le matériau fissile dans les engins nucléaires (Yinon, 1990; Card et Autenrieth, 1998). Du point de vue du comportement dans l'environnement, le HMX est peu hydrosoluble ($3.3\text{-}6.6 \text{ mg.L}^{-1}$ à 20°C) ce qui implique que sa lixiviation vers les eaux souterraines est à priori limitée et il est donc relativement persistant dans les sols contaminés comme ceux des installations militaires (Talmage *et al.*, 1999; Monteil-Rivera *et al.*, 2003). Néanmoins, du fait de sa faible affinité pour les sols, le HMX est susceptible de migrer lentement vers les couches plus profondes du sol. En ce qui concerne la partition du HMX dans les sols, il a été mis en évidence que la sorption du HMX est essentiellement régie par la teneur en argile alors qu'elle est insensible à la matière organique (Monteil-Rivera *et al.*, 2003). On peut donc s'attendre à ce que la biodisponibilité du HMX dans les sols soit fortement régie par la teneur en argile mais cela reste à vérifier dans des sols prélevés sur le terrain. Dans le cadre de nos travaux, le HMX a été retenu comme composé énergétique modèle en raison de sa prévalence

et son abondance dans le sol de nombreuses zones militaires d'entraînement canadiennes, en particulier sur les périmètres de tir anti-tank (Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004; Pennington *et al.*, 2006).

En matière d'accumulation dans les organismes, le potentiel du HMX est faible en raison de son faible $\log K_{ow}$ [0.06-0.26] ce qui en fait un composé peu lipophile (Talmage *et al.*, 1999). Les effets et la toxicité du HMX pour les animaux terrestres supérieurs a été étudiée et, de façon générale, ils sont inférieurs à ceux du TNT (Yinon, 1990; Talmage *et al.*, 1999; USACHPPM, 2001). La toxicité du HMX à l'égard des invertébrés terrestres a également été caractérisée. Talmage *et al.* (1999) n'ont pas réussi à dériver de valeur de référence pour le HMX chez le ver de terre, le nombre de données disponibles à ce moment étant insuffisant. Depuis, plusieurs études en laboratoire ou sur le terrain sont venues compléter la base de données existante. Le tableau 1.3 résume les connaissances actuelles sur les effets toxiques aigus et chroniques du HMX sur le ver de terre dans différents types de sol. L'ensemble des études disponibles concordent au moins sur un point : aucune létalité due au HMX n'a été observée et ce, même aux plus hautes concentrations testées – 2503 mg.kg⁻¹ en sol artificiel (Robidoux *et al.*, 2001), 711 mg.kg⁻¹ en sol forestier (Robidoux *et al.*, 2002) et 5000 mg.kg⁻¹ en sol sableux SSL (Sassafras Sandy Loam) (Simini *et al.*, 2003). En revanche, le HMX génère des effets sous-létaux comme la diminution de la reproduction chez le ver de terre à partir de concentrations relativement basses (tableau 1.3). Ainsi, Simini *et al.* (2003) ont rapporté une CE₂₀ et une CE₅₀ de 2.7 et 8.5 mg.kg⁻¹ respectivement. On constate également que la toxicité pour la reproduction varie de façon assez importante selon le type de sol puisque des CE₅₀ de 15.6 et 280 mg.kg⁻¹ ont été obtenues en sol naturel forestier et en sol artificiel respectivement. Plus récemment, Savard *et al.* (2007) ont fait état d'une CE₅₀ de 31 mg.kg⁻¹ dans un sol forestier à haute teneur en matière organique amendé avec du HMX. Cela est sans doute attribuable à la différence de biodisponibilité du HMX entre les sols examinés. Ce postulat est étayé par la disparité de toxicité observée entre un sol sablonneux fraîchement amendé avec du HMX et le même sol vieilli (Simini *et al.*, 2003). De plus, des études ont également été menées avec des sols issus d'une zone d'entraînement sur une base militaire et principalement contaminés par du HMX (Robidoux *et al.*, 2004a, b). Les résultats obtenus n'ont pas permis d'établir de lien entre la toxicité décelée et les teneurs en HMX du sol,

pourtant souvent plus élevées que celles utilisées dans les travaux avec les sols amendés. Des variations de biodisponibilité du HMX et/ou la contribution d'autres contaminants (tels que les métaux) ont été suggérées pour expliquer cette différence entre les données recueillies en laboratoire et sur le terrain (Robidoux *et al.*, 2004a). Quant aux effets sous-létaux du HMX autres que ceux sur la reproduction, ils ont été peu investigués. Les études précédemment mentionnées de Robidoux *et al.* (2004a, b) semblent indiquer que le HMX, comme le TNT, affecte l'intégrité de la membrane lysosomiale des coelomocytes chez le ver de terre. Lors de travaux préliminaires, Savard (2005) a récemment observé des effets du HMX sur les enzymes du stress oxydant, *i.e.* la catalase et la superoxyde dismutase chez *E. andrei* exposé à un sol forestier additionné de HMX et de mélanges Pb+HMX. Cependant, les réponses détectées devraient être corroborées par d'autres expériences, vu que seulement deux concentrations ont pu être testées. Si on peut aisément affirmer que le HMX exerce chez le ver de terre une toxicité sous-létale chronique plutôt qu'aiguë, la connaissance des propriétés toxiques du HMX pour les invertébrés terrestres reste assez restreinte et les mécanismes de cette toxicité ne sont pas encore élucidés.

Tableau 1.3. Effets aigus et chroniques du HMX pour *Eisenia* sp. dans différents types de substrat

Type de sol	Caractéristiques du sol	Durée de l'exposition (j)	CL ₅₀ ou CE ₅₀ (mg.kg ⁻¹)	CSEO (mg.kg ⁻¹)	CME0 (mg.kg ⁻¹)	Source
<i>Effets aigus - Létalité</i>						
Artificiel	70% silice, 20% kaolinite, 10% sphaigne + 1% CaCO ₃ pH = 6	14	> 2503	2503	> 2503	Robidoux <i>et al.</i> (2001)
Artificiel	70% silice, 20% kaolinite, 10% sphaigne + 1% CaCO ₃	14	> 500	500	> 500	Philips <i>et al.</i> (1993)
Naturel forestier sablonneux	83% sable, 9% silice et 8% argile pH = 7.6; Matière organique = 3.8%	14	> 711	711	> 711	Robidoux <i>et al.</i> (2002)
<i>Toxicité chronique – Nombre total de cocons</i>						
Artificiel	Cf. supra	56	< 280	< 280	280	Robidoux <i>et al.</i> (2001)
Naturel forestier sablonneux	Cf. supra	56	< 15.6	< 15.6	15.6	Robidoux <i>et al.</i> (2002)
Naturel sablonneux (fraîchement amendé)	Marne fine, sableuse et siliceuse	56	8.5	15.6	36	Simini <i>et al.</i> (2003)
Naturel sablonneux (vieilli et traitement simulant les conditions extérieures)	69% sable, 13% silice, 17% argile pH = 5.2; Matière organique = 1.2%; CEC [#] = 5.5 cmol.kg ⁻¹	56	n.d.*	562	> 562	Simini <i>et al.</i> (2003)
Naturel forestier sablonneux	89.8% sable, 9% silice, 1.2% argile pH = 7.2; COT [§] = 20%; CEC [#] = 48.2 cmol.kg ⁻¹	56	31	15	152	Savard <i>et al.</i> (2007)

* n.d. : non déterminé.

[#] CEC : Capacité d'Échange Cationique.[§] COT : Carbone Organique Total.

I.3.2 Les métaux

La plupart des métaux sont ubiquitaires dans l'environnement tandis que d'autres sont introduits dans les systèmes naturels par l'homme (Alloway, 1995). Les activités humaines sont à l'origine d'une pollution croissante des sols par les métaux dont il existe diverses sources anthropogènes : l'extraction minière et la fonte du minerai, les produits chimiques utilisés en agriculture et en horticulture, les boues d'épuration, la combustion des carburants fossiles, l'industrie métallurgique, les appareils électroniques, l'industrie chimique lourde, l'élimination des déchets, la chasse et la pêche sportive ainsi que les conflits armés et l'entraînement militaire (Alloway, 1995). C'est à cette dernière source de contamination que nous nous intéresserons tout particulièrement. En effet, les opérations militaires provoquent une contamination croissante des sols qui y sont assujettis par de multiples métaux (dont la plupart sont reconnus toxiques), du fait qu'il ne sont pas biodégradables (Bricka *et al.*, 1994; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004; Wingfors *et al.*, 2006). Par contre, la spéciation chimique des métaux varie en fonction des caractéristiques du milieu, c'est-à-dire avec les propriétés physico-chimiques du sol dans notre cas (Alloway, 1995). Or, il est bien établi que la biodisponibilité et la toxicité des métaux envers les organismes vivants sont fortement déterminées par la forme sous laquelle ils surviennent dans l'environnement (Allen, 2002; Peijnenburg et Jager, 2003).

Le plomb (Pb)

Le plomb a été sélectionné comme contaminant métallique modèle pour les expériences en sol amendé dans le cadre des présents travaux de recherche. En effet, le Pb est un contaminant majeur des sites d'entraînement militaires, notamment canadiens (Bricka *et al.*, 1994; Alloway, 1995; Robidoux *et al.*, 2000b; Marois *et al.*, 2004; Thiboutot *et al.*, 2004; Wingfors *et al.*, 2006). Le Pb peut se rencontrer sous différentes formes chimiques dans l'environnement : halides, hydroxydes, oxydes, carbonates ou sulfates (USEPA, 2005). Lorsqu'il est relargué dans le sol, le Pb passe habituellement de composés solubles à des dérivés sulfate ou phosphate relativement insolubles. En outre, il peut former des complexes

avec la matière organique et les argiles ce qui réduit également sa mobilité (Davies, 1995; USEPA, 2005). Cela confère au plomb dans les sols un caractère persistant et relativement immobile. Le plomb est le plus disponible dans des sols sablonneux acides contenant peu de matériaux à même de le lier alors qu'à l'inverse, les concentrations de Pb dans l'eau interstitielle atteignent leur minimum entre pH 5 et 6 du fait de la formation de complexes organométalliques dans cet intervalle de pH (Sauvé *et al.*, 1998). D'autre part, il est estimé que seule une petite fraction du Pb [0.2-1%] dans les sols contaminés en plomb est généralement présent sous forme hydrosoluble (USEPA, 2005). Cependant, la labilité et la biodisponibilité du Pb dans les sols peuvent varier sensiblement en fonction de plusieurs facteurs physico-chimiques du sol incluant le pH, la capacité d'échange cationique, la texture, la composition et les teneurs en métaux (Alloway, 1995; Davies, 1995).

La toxicité du Pb et ses modalités d'accumulation dans les vers de terre sont bien documentées (Hopkin, 1989; Efroymsen *et al.*, 1997; Nahmani *et al.*, 2007). Par conséquent, nous en ferons ici une synthèse succincte et nous nous attarderons plutôt sur la modulation des effets délétères du Pb due à la biodisponibilité dans différents sols. Contrairement au HMX, on peut aisément observer de la létalité suite à une exposition au Pb (Efroymsen *et al.*, 1997). Les vers de terre sont néanmoins capables de tolérer des niveaux relativement élevés de Pb dans le sol (Davies *et al.*, 2003a). En fait, les vers de terre peuvent accumuler des concentrations assez élevées car ils les stockent sous une forme non-toxique dans leurs tissus, dans des granules minéraux (Morgan et Morgan, 1998; Morgan *et al.*, 1999). On a mis en évidence que le tissu chloragène est l'organe principal de stockage du Pb chez les vers de terre (Hopkin, 1989 et littérature jointe; Morgan et Morgan, 1989). Une des particularités du plomb est que son entrée et son accumulation dans les vers de terre est influencée par les niveaux de calcium exogène et interne (Morgan et Morgan, 1988a, b). Hormis la toxicité générale létale et sous-létale (comme l'inhibition de la reproduction) du Pb, d'autres effets plus spécifiques sur le métabolisme ont été décelés chez le ver de terre. Ainsi, le Pb, comme nombre d'autres métaux (Svendsen *et al.*, 2004), fragilise la membrane lysosomiale des coelomocytes (Reinecke et Reinecke, 2003). On a aussi constaté que le Pb inhibait la catalase chez *E. andrei* lors d'expositions *in vitro* et *in vivo* sur papier filtre (Labrot *et al.*, 1996). Des expériences ont également été réalisées en sol artificiel amendé avec du Pb et les résultats

obtenus ont révélé la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ou radicaux libres) ainsi qu'une tendance à la baisse de l'activité de la catalase avec l'augmentation des concentrations en Pb, mais non significative (Saint-Denis *et al.*, 2001). Cet écart entre les effets relevés sur papier filtre et en sol artificiel peut être imputable à une différence de biodisponibilité entre les deux matrices.

La modulation des effets biologiques du Pb chez le ver de terre selon le type de sol et ses propriétés, dont la biodisponibilité du Pb, est une question qui a été examinée. On s'est alors rendu compte que la biodisponibilité était un déterminant majeur dans les effets et la toxicité éventuellement exercée, selon une gamme allant de l'absence d'effets jusqu'à la mortalité complète des organismes (Lanno *et al.*, 2004). Dans ce sens, Bengtsson *et al.* (1986) ont démontré qu'une diminution de pH du sol augmentait considérablement la toxicité du Pb (survie, paramètres de la reproduction). Récemment, Bradham *et al.* (2006) ont analysé l'incidence des caractéristiques physico-chimiques de 21 sols naturels enrichis en Pb (2000 mg.kg⁻¹) sur la biodisponibilité, la toxicité (survie, reproduction) et l'accumulation du Pb chez *E. andrei*. Les résultats ont révélé des variations substantielles dans la toxicité et l'accumulation, et donc dans la biodisponibilité du Pb parmi les sols et des corrélations ont été établies entre les propriétés des sols et les variables précitées. Des modèles exprimant les paramètres de toxicité et la teneur tissulaire en Pb des vers de terre en fonction desdites propriétés du sol ont également été dérivés. Ces observations mettent en évidence le rôle majeur de la biodisponibilité dans la détermination de la toxicité du Pb et l'importance de la prendre en compte, notamment pour l'évaluation de sites contaminés et des risques qui y sont associés. A ce propos, le tableau 1.4 ci-dessous expose quelques valeurs de toxicité sous-létales du plomb pour des situations représentatives (sol amendé expérimentalement, sol contaminé *in situ*...) qui illustrent les fluctuations de biodisponibilité et la portée de ce facteur, en particulier dans l'extrapolation des impacts à partir de données de laboratoire vers celles du terrain.

Tableau 1.4. Toxicité chronique du plomb pour *Eisenia* sp. dans différents types de substrat

Forme de Pb	Type de sol/substrat	Caractéristiques du sol	Durée de l'exposition (j)	CE ₅₀ (mg.kg ⁻¹)	CSEO (mg.kg ⁻¹)	CMEO (mg.kg ⁻¹)	Source
Toxicité chronique – Nombre total de cocons							
Pb(CH ₃ COO) ₂ aqueux	Fumier de cheval + sol	n.d.*	56	4000	2000	4000	Malecki <i>et al.</i> (1982)
Pb(NO ₃) ₂ aqueux	Artificiel	70% silice, 20% kaolinite, 10% sphaigne pH = 6.3	56	1940	1810	2000	Spurgeon <i>et al.</i> (1994)
Pb(NO ₃) ₂ solide	Naturel Terreau « Kettering »	pH = 6.7; COT [#] = 2.8%; CEC [§] = 17.6 cmol.kg ⁻¹	28	993	625	1200	Davies <i>et al.</i> (2003b)
Pb(NO ₃) ₂ aqueux	Artificiel	70% silice, 20% kaolinite, 10% sphaigne pH = 6.1	21	1629	608	2000	Spurgeon et Hopkin (1995)
n.d.*	Naturel Site de fonderie	pH = 5.5-7.3; Matière organique = 9.4-27.1% 89.8% sable, 9% silice, 1.2% argile	21	2131	492	842	Spurgeon et Hopkin (1995)
Pb(NO ₃) ₂ aqueux	Naturel Forestier sablonneux	pH = 7.2; COT [#] = 20%; CEC [§] = 48.2 cmol.kg ⁻¹	56	1068	758	1517	Savard <i>et al.</i> (2007)

* n.d. : non déterminé.

[#] COT : Carbone Organique Total.

[§] CEC : Capacité d'Échange Cationique.

CHAPITRE I

INFLUENCE DU TYPE DE SOL ET DE LA PRÉSENCE DE VERS DE TERRE SUR LA BIODISPONIBILITÉ DU PLOMB ET DU HMX

Ce chapitre a été soumis pour publication à *Ecotoxicology and Environmental Safety* sous le titre suivant:

The influence of soil type and earthworm presence on the bioavailability
of Pb and HMX

Yann Berthelot, Matthias Blanchard, Aurélie Auroy, Kathleen Savard,
Pierre Yves Robidoux, Bertin Trottier

1.1 Résumé - Abstract

Résumé :

La biodisponibilité des xénobiotiques est une question centrale pour la compréhension des effets délétères sur le biota et les écosystèmes ainsi que pour leur prédiction, notamment dans des environnements hétérogènes comme les sols. Le Pb et le HMX (octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine) sont des contaminants prédominants dans les sols des installations militaires. La toxicité du Pb et du HMX à l'égard des principaux récepteurs écologiques est connue mais l'ampleur de leur biodisponibilité nécessite une meilleure caractérisation. Leur biodisponibilité en présence et en l'absence de vers (*Eisenia andrei*) a été examinée et comparée dans deux sols différents, un sol sablonneux sain avec une faible teneur en matière organique (0.02% Carbone Organique Total, COT) prélevé sur un Champ de Tir et un Secteur d'Entraînement (CTSE) canadien et un sol forestier à texture sablonneuse et organique (20% COT). Des paramètres toxicologiques et des mesures chimiques (bioaccessibilité/extractabilité dans l'eau) ont été utilisés afin de déterminer la biodisponibilité du Pb ou du HMX pour les vers de terre. Le Pb et le HMX étaient plus biodisponibles dans le sol le plus sablonneux (>90% sable) vu qu'ils étaient plus toxiques et accessibles, le Pb tout particulièrement. La présence de vers a modifié la bioaccessibilité du Pb mais pas les concentrations de HMX soluble. Ces résultats ont des implications importantes pour l'évaluation de la santé des sols et du risque écotoxicologique, notamment sur les sites militaires.

Mots-clés : Biodisponibilité; Bioaccessibilité; Ver de terre; Explosifs; HMX; Métaux; Sites militaires; Pb; Sol

Abstract:

Bioavailability of xenobiotics is a central issue for the understanding of deleterious effects on biota and ecosystems as well as for their prediction, particularly in such heterogeneous environments like soils. Pb and HMX (octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine) are prevalent soil contaminants at military installations. Pb and HMX toxicity towards main soil ecological receptors is known but the extent of their bioavailability needs better characterization. Their bioavailability with and without earthworms (*Eisenia andrei*) were assessed and compared in two different soils, a highly sandy clean soil with low organic matter content (0.02% Total Organic Carbon, TOC) collected on a Canadian Range and Training Area and a sandy-type organic forest soil (20% TOC). Toxicological parameters and chemical measurements (bioaccessibility/extractability in water) were used to determine bioavailability of Pb or HMX to the earthworms. Pb and HMX were more bioavailable in the most sandy (>90% sand) soil as they were more toxic and accessible, but more markedly for Pb. Earthworm presence modified Pb bioaccessibility but not soluble HMX concentrations. These findings have important implications for soil health and risk assessment, especially on military sites.

Keywords: Bioavailability; Bioaccessibility; Earthworm; Explosives; HMX; Metals; Military sites; Pb; Soil

This study was funded by Defence Research and Development Canada (DRDC) - Valcartier, QC (Canadian Ministry of National Defence).

We certify that all experiments presented in this manuscript were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of human subjects and animal welfare. Please note that earthworms do not fall under any specific regulation in this area.

1.2 Introduction

Soil properties are recognized to affect bioavailability and toxicity of contaminants in soils, particularly metals (Allen, 2002; Hund-Rinke and Kördel, 2003; Peijnenburg and Jager, 2003; Tomson et al., 2003). Bioavailability is a complex and major issue in ecotoxicology and risk assessment of contaminated areas, especially for heterogeneous environments such as soils (Van Gestel and Weeks, 2004). This domain of knowledge is however not univocal as different definitions have been proposed and used (Peijnenburg et al., 1997; Baveye and Bladon, 1999; Peijnenburg and Jager, 2003; Lanno et al., 2004). In the present text, the terms “bioavailability” and “bioaccessibility” are employed. For that scope, as outlined in Berthelot et al. (2008), bioavailability means “the fraction of a substance that will exert an effect in an organism” whereas bioaccessibility constitutes “the fraction of a substance which is readily mobilizable by an organism in a soil”. Bioavailability is therefore considered from a biological viewpoint while bioaccessibility represents a variable of chemical nature.

Lead is a primary component of both conventional shotshells and ammunition envelopes of heavier military armament (Johnson et al., 2005; Ma et al., 2007; Rooney et al., 2007). Consequently, it belongs to the group of principal contaminants found on military training ranges (Thiboutot et al., 2004; Wingfors et al., 2006). Toxicity of Pb to earthworms has been characterized and is well documented (Efroymson et al., 1997 and literature cited therein; Davies et al., 2003a, 2003b;

Nahmani et al., 2007). Toxic effects range from reproduction impairment to growth decline and even mortality at higher concentrations (LC_{50} s from 759 to >15996 mg Pb kg^{-1} , depending on the type of soil). Nevertheless, it has been demonstrated that Pb toxicity and bioaccumulation is markedly modulated by soil characteristics (Nahmani et al., 2007). In line with that, Ma et al. (1982, 1983) noted that Pb accumulation in the earthworm body was influenced by soil pH, organic matter or cation exchange capacity (CEC). Bengtsson et al. (1986) also evidenced that Pb toxicity, reflected in increased earthworm mortality and reduced reproduction, was higher in acidified soils.

More recently, Bradham et al. (2006) assessed the toxicity of Pb to *Eisenia fetida* in different soils in order to determine the soil parameters affecting Pb toxicity. They even established correlations and derived models linking toxicity endpoints to significant soil properties. However, this study examined only one Pb concentration while Bengtsson et al. (1986) tested two concentrations. Also, Nahmani et al. (2007) investigated the influence of soil properties on the toxicity of ten different soils (including eight metalliferous soils with a multiple contamination and two reference soils) on *E. fetida*. They obtained good regressions between toxic responses (lethality, body weight change and reproduction parameters) and soil properties (encompassing bulk soil metal concentrations), metal concentrations in soil solution or metal tissue concentrations in the worms. As a rule, the relationships were stronger with metal concentrations in soil solution than with bulk soil metal

concentrations. This was particularly true for Pb with respect to lethality and cocoon production. Conder and Lanno (2000) showed that soluble metal (including Pb) concentrations in 0.1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ soil extracts reflected much better the actual exposure level and were better related to toxicity than total concentrations, thereby illustrating the importance of bioaccessibility.

Together with metals, energetic materials (EM) are the other main family of contaminants found on military Range and Training Areas (RTA; Talmage et al., 1999; Robidoux et al., 2004b). Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) is one of the predominant EM occurring on military RTA due to its incorporation in explosive formulations used in ammunition (Yinon, 1990) and its low aqueous solubility, 6.6 mg L^{-1} at 20°C (Talmage et al., 1999; Marois et al., 2004; Thiboutot et al., 2004). HMX is known to alter earthworm reproduction but is not lethal, at least for concentrations up to 2503 mg kg^{-1} (Robidoux et al., 2001, 2002; Simini et al., 2003). The effects of bioavailability of HMX in soils are however poorly characterized. The susceptibility to the different bioavailability-controlling soil factors varies with chemical class (Tomson et al., 2003). So, since Pb is a metal and HMX is an organic compound, their bioavailability and soil mobility profiles may not be influenced by the same bioavailability-governing factors. Monteil-Rivera et al. (2003) demonstrated that HMX sorption to soils is low relatively to other compounds and is mainly controlled by the clay content. Yet, they concluded that HMX has a good potential to persist at active antitank firing ranges because of its

low water solubility and recalcitrance to biodegradation. Thus, determining the bioavailability of HMX in soils as well as the effect of soil properties on it is a key component of soil toxicity assessment on RTAs.

Organisms can also change the environment in which they live. This is true for earthworms and soils via bioturbation. This activity creates microenvironments in the substrate which may modify contaminant bioavailability (Tomson et al., 2003). Some studies have actually reported an incidence of earthworm presence on metal mobility (Wen et al., 2004, 2006) or on biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT; Renoux et al., 2000). The aforementioned phenomena can have consequences on soil quality as well as remediation procedures which are often based on the reduction of bioavailability.

The aims of this study were to: (1) assess and compare the bioaccessibility and bioavailability (quantified through earthworm toxicity measurement endpoints) of Pb and HMX in two soils with contrasting physico-chemical properties and (2) investigate the effect of earthworm presence on the accessibility of the selected toxicants.

1.3 Materials and methods

1.3.1 *Chemicals and reagents*

Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX; CAS 2691-41-0; purity > 99%) was obtained from Produits Chimiques Expro (Valleyfield, QC, Canada). Lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; CAS 10099-74-8) and potassium nitrate (KNO_3 ; CAS 7757-79-1) were acquired from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Concentrated trace-metal grade HNO_3 was provided by Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). The pesticide carbendazim (CAS 10605-21-7) was used as a reference toxicant, and was obtained from EM Science (Darmstadt, Germany). Other chemicals were ACS reagent grade and were purchased from commercial suppliers. Deionized water (ASTM, type II) was obtained using a Super-Q water purification system (Millipore®) or Zenopure® Mega-90. Glassware was washed with phosphate-free detergent followed by rinses with acetone, nitric acid (10%, v/v), and deionized water.

1.3.2 *Soil characteristics and handling*

Two sandy-type soils were used in this study. The first one, a soil collected on a Canadian military base and labelled RDDC2004, was sampled within a clean area on the Canadian Forces Base of Valcartier (QC, Canada). The results generated in this latter soil will be compared to those obtained in a second one, a sandy-type organic (20% total organic carbon) forest soil designated RacFor2002, described in Savard et

al. (2007). The physical characteristics of the two soils are summarized in Table 2.1. The chemical profile of those soils showed that selected organic contaminants (*e.g.*, polyaromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, and pesticides) were not detected except di(2-ethylhexyl) phthalate (2.8 mg kg^{-1}) in RacFor2002. Total concentrations of metals in both soils were found to be within regional background concentration ranges (Table 2.2) or were not detected (As, Be, Li, Cd, Mo, Sb, Se, and Sn).

Artificial soil (substrate for reference toxicant) consisted of 70% (w/w) grade 4010 silica sand (Unimin Canada, ON), 20% colloidal kaolinite clay (CAS: 1332-56-7; EPK Clay, Edgar, FL), 10% 2-mm sieved Canadian sphagnum peat (Premier Horticulture, Red Hill, PA) according to the Organisation for Economic Cooperation and Development Guideline (1984). Calcium carbonate (1%, w/w) was used to adjust the pH of the wetted substrate to 6.0 ± 0.5 .

The soils (RDDC2004 and RacFor2002) were spiked using different concentrations of Pb in water solution and different concentrations of HMX in acetone solution. The $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ was first dissolved in deionized water at defined concentrations before being spiked onto the soil. In the case of RDDC2004, 3 kg of soil were then placed into glass containers. The metal solution or water (negative control) was applied to the soil surface and the soil was hand-mixed. The soil was then let to dry and stabilize in a greenhouse for 14 days at ambient temperature (20°C). Thus, the metal could reach a pseudo-equilibrium state with the soil (Kula

and Heimbach, 1998; Davies et al., 2003a). HMX was dissolved in acetone at defined concentrations before being incorporated to the soil. An appropriate volume of HMX solution ($30 \text{ mL} \cdot 3 \text{ kg}^{-1}$ wet weight of soil) was applied and the solvent allowed to evaporate in the dark for 48h in a chemical hood to reach selected HMX concentrations and a low and non-toxic level of acetone in the soil (Robidoux et al., 2004a). Finally, soils spiked with Pb or HMX were mixed for 18 h in a three-dimensional rotary mixer. The handling and spiking protocol of the RacFor2002 soil are detailed in Savard et al. (2007). Briefly, the procedure was the same as described for RDDC2004 except that batches of 2.5 kg of soil were used and, for HMX exposure, those batches received 20 mL of the appropriate HMX solution. Two series of experiments were conducted. In the RDDC2004 soil, exposure tests with Pb or HMX were performed. Nominal concentrations were, on a dry weight basis: 25, 50, 100, 200, 400, 750 and 1500 mg kg^{-1} for Pb and 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15 and 150 mg kg^{-1} for HMX. In the RacFor2002 soil, nominal concentrations were: 758 and 1517 mg kg^{-1} for Pb or 15 and 152 mg kg^{-1} for HMX as mentioned in Savard et al. (2007).

500 g dry soil were rehydrated to 75% of the water-holding capacity (WHC) with deionized water at the beginning of the experiment with RDDC2004. In the case of RacFor2002, 250 g dry soil were used due to the bulky nature of this soil which made that 500 g had too large a volume for the jars.

1.3.3 Earthworms

The oligochaetes *Eisenia andrei* were obtained from Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were initially used to establish the laboratory cultures. Earthworms were maintained in a commercial bedding (Magic Products, Amherst Jct, WI, USA) supplemented with dry cereal (Magic Worm Food, Magic Products), at $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, 70-80% humidity and a light/dark cycle (16h ON/ 8h OFF). In the following toxicity tests, only adult earthworms (ranging from 300 to 600 mg wet weight) having a well-developed clitellum were used.

1.3.4 Earthworm reproduction test

The effects of Pb or HMX-spiked soils on growth and reproduction of *E. andrei* were assessed using the standard test protocol (International Organization for Standardization, 1998). Following a 24-h acclimation in clean soil, ten *E. andrei* were individually rinsed, weighed and added to each replicate 1-L glass jar containing the toxicant-amended soil except in the earthworm-deprived replicate. Jars were closed using lids with 1.6 mm air holes. Food (2 g of dry cereal) was added to the surface of the test matrix at the beginning of the experiment and then once weekly. After 28 days of exposure, the earthworms were hand sorted from the soil and the number of surviving *E. andrei* (per jar) as well as the individual weight (wet biomass) were recorded. The remaining soil (containing cocoons and juveniles) was then returned to the respective jars and incubated for another 28 d for further

exposure of cocoons and juveniles to the test soil. At the end of the experiment (day 56), the juveniles were extracted from the soil by heating the jars (55-60°C) and whole soil samples were wet sieved. The number of hatched and non-hatched cocoons as well as the number of juveniles and their biomass were recorded. The pH was measured before and after each test using a 1:5 (v/v) suspension of soil in water (International Organization for Standardization, 1994). Soil water content of the jars was adjusted each week but was also measured by loss of soil weight on drying (18 ± 2 h at 105°C) at the beginning and the end of each test.

1.3.5 Bioaccessibility assessment

The chemically bioaccessible Pb and water-soluble HMX fractions are defined as the maximal toxicant concentration extracted from the soil using a weak neutral salt aqueous solution. For this purpose, the extraction method in 0.01 M KNO₃ aqueous solution of Sauvé et al. (1997, 1998) was performed in triplicate at the beginning and the end of the reproduction test. A solid-liquid ratio of 1:2 was used for the low organic content RDDC2004 soil but a ratio of 1:10 was applied for the organic RacFor2002 soil so as to separate the leachate from the solid soil phase, according to the protocol. The moisture content of the soil samples was taken into account in the calculation of the added volume of KNO₃ solution. The samples were then gently shaken with a rotary mixer at 50 rpm for 18 ± 2 h at room temperature. Next, a centrifugation (10 000xg, 30 min, 20°C) was performed. Supernatant was carefully

removed, the pellet was discarded and supernatant pH was recorded. The supernatant was then filtered through a 0.45 μm Millipore polytetrafluoroethylene membrane. For Pb, the filtrate was placed into 30 mL polyethylene vials and acidified at 2% (v/v) with trace metal quality HNO_3 for conservation at 4°C until analysis. For HMX content analysis, an aliquot of the extract was mixed with acetonitrile (1:2, v/v) and let at 4°C for 1 h for possible precipitation. Samples were then shortly centrifuged (4 000xg, 5 min, 4°C) and transferred into HPLC vials. The remainder was placed into 20 mL glass vials for conservation at 4°C. Finally, total soluble metal and HMX contents were analyzed in the extract as described below. These results together with total Pb and HMX soil concentrations served to calculate bioaccessible or soluble soil contaminant fractions (as the ratio between KNO_3 extractable and total contaminant concentrations) as well as distribution coefficients (K_d) for both substances.

1.3.6 Chemical analyses

Concentrations of HMX were determined in soil and aqueous KNO_3 extracts. HMX was extracted from soil sampled at the beginning ($t = 0$), at mid-term ($t = 28$ d) and at the end ($t = 56$ d) of the experiments according to the U.S. Environmental Protection Agency Method 8330 (USEPA, 1997). Briefly, acetonitrile (10 mL) was added to a weighed soil sample (2 g – dry wt) and then vortexed for one minute. The preparation was then sonicated (60 Hz) for 18 ± 2 h at 20°C. Next, 5 mL of

supernatant were combined with 5 mL of CaCl_2 aqueous solution (5 g L^{-1}) in a 20-mL vial and then filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore polytetrafluoroethylene membrane. The first 1 mL of filtrate was discarded, and the remainder was analyzed for HMX content by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Robidoux et al., 2001, 2002). The instrumental detection limit for HMX was $34 \mu\text{g L}^{-1}$ so corresponding limits of quantification (LOQ) were 0.29 mg kg^{-1} (dry weight) in soil and 0.14 mg kg^{-1} (as expressed per amount soil dry weight) in soil aqueous KNO_3 extracts.

Pb was extracted from soil sampled at the beginning ($t = 0$), at mid-term ($t = 28 \text{ d}$) and at the end ($t = 56 \text{ d}$) of the experiments. This was achieved using a conventional digestion procedure with concentrated trace-metal grade HNO_3 (Sauvé et al., 1997). Total-recoverable Pb content in soil and Pb concentrations in aqueous bioaccessibility fractions were measured by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) or inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) when concentrations were below detection limits of ICP-AES. The analytical detection limits for Pb were 10 mg kg^{-1} (dry weight) in soil and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ in soil aqueous KNO_3 extracts with a corresponding limit of quantification (LOQ) of 0.002 mg kg^{-1} (as expressed per amount soil dry weight).

1.3.7 *Quality control*

All experiments were done in quadruplicates, and included negative controls (soil added with water only) and vehicle (soil amended with acetone only) controls. In parallel, one replicate without earthworms was added to assess the effect of their presence on contaminant load and bioavailability in the soil. Mortality, growth, and reproduction endpoints in the reference toxicant and other established criteria (*e.g.*, response in the negative control, temperature) were verified against laboratory in-house control data to validate the toxicological analyses. The positive control results using the reference toxicant carbendazim (EC_{50} for the number of juveniles of $2.04 \pm 0.14 \text{ mg kg}^{-1}$ dry artificial soil) were consistent with in-house data and previous studies (Robidoux et al., 2004a).

1.3.8 *Data analysis*

Toxicity endpoints such as the EC_p (estimated effect concentration [EC] causing a percentage [p] inhibition of a measurement endpoint compared to vehicle control groups), the NOEC and the LOEC were determined on the measured concentrations using the ToxCalc program (version 5.0; Tidepool Scientific Software, McKinleyville, CA). The EC_{50} (LC_{50} for adult lethality) was chosen as a representative toxicity level point estimate (median). Dunnett's Multiple Comparison Test was used to determine the LOEC and NOEC ($p \leq 0.05$). Linear interpolation with bootstrapping was used for point-estimates. Data were expressed as the average

\pm standard deviation (SD). To detect differences from control and between all pairs, parametric statistics as Dunnett's and Tukey-Kramer's Multiple Comparison Tests were performed. When data did not comply with parametric conditions, they were ranked and the aforementioned tests were run thereby becoming non-parametric analyses. Pairwise correlations were also carried out by resolving standard correlation coefficients or Spearman's Rho for non-parametric data. The Jump In 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to perform statistical analysis.

1.4 Results

1.4.1 Physico-chemical characteristics of soils

The RDDC2004 soil was noticeably more acidic than the RacFor2002. Organic carbon content (TOC), cation exchange capacity as well as the amount of amorphous Fe and Al oxides contrasted widely between RDDC2004 and RacFor2002, the latter being more organic and rich in sorption sites including metal oxides (Table 2.1). This situation is further illustrated by a corresponding difference in CEC between the two soils. Also, although texture and granulometry of both soils were mainly sandy, the proportion of sand was higher in RDDC2004 while its clay and silt content was somewhat lower. This layout is indicative of divergences in bioavailability between the soils (Van Gestel and Weeks, 2004; Spurgeon et al., 2006).

As reported earlier (Savard et al., 2007), the measured soil Pb and HMX concentrations in RacFor2002 were comparable to nominal concentrations (*i.e.*, 811 ± 67 and 1533 ± 79 mg kg⁻¹ dry soil for Pb and 16 ± 2 as well as 147 ± 13 mg kg⁻¹ dry soil for HMX at $t = 0$). This was also true in RDDC2004 where t_0 measured concentrations were: 27 ± 5 , 57 ± 3 , 97 ± 20 , 182 ± 19 , 359 ± 81 , 623 ± 73 and 1128 ± 256 mg Pb kg⁻¹ dry soil or <0.3 (limit of quantification), 0.4 ± 0.1 , 1.4 ± 0.2 , 4.6 ± 0.2 , 13 ± 2 and 141 ± 13 mg HMX kg⁻¹ dry soil. Comparison of HMX concentrations at the beginning and the end of the experiment (t_{56} : <0.3 , 0.27 ± 0.01 , 1.2 ± 0.2 , 4.1 ± 0.2 , 13 ± 1 and 137 ± 11 mg HMX kg⁻¹ dry soil) revealed no significant degradation of HMX during the exposure period.

1.4.2 Incidence of worms presence on soil pH

In Pb-spiked RDDC2004, average initial soil pH before introducing the worms was 4.4 and it rose significantly to 6.7 between the beginning and the mid-term of the experiment, after which time it increased again until the end of the test but the extent of the rise was smaller (Fig. 2.1). No such evolution was observed in the jars without earthworms. Moreover, the initial and final soil pH in the jars without earthworms did not significantly differ from that of jars intended for the worms before they were introduced. Conversely, soil pH at mid-term and the end of the test was significantly higher in treatments with worms than in treatments exempt of worms (results not shown). The same situation prevailed for the HMX exposure in

RDDC2004 (data not presented). On the other hand, the initial soil pH for Pb-contaminated RacFor2002 was 7.4 and it remained stable throughout the whole duration of the experiment (results not reported). Likewise, no significant difference was observed between soil pH of the jars with and without worms at any stage of the test. The pH within the jars devoid of earthworms did not fluctuate significantly in time as well. Again, the pattern was the same for HMX.

1.4.3 Bioaccessible Pb and soluble HMX levels in the two soils

Bioaccessibility data for Pb and HMX in the two soils tested are summarized in Table 2.3. In general, Pb bioaccessibility contrasted markedly between RDDC2004 and RacFor2002 but this outcome was modulated by time and the presence of worms. Initially, Pb was more bioaccessible in RDDC2004 as the values were within separate ranges but the increasing Pb spikes were clearly detected in the extracts from both soils (Fig. 2.2a, b and Table 2.3). This outcome was also reflected in the discrepancies of the bioaccessible soil Pb fraction and K_d between RDDC2004 and RacFor2002 (Table 2.3). In RDDC2004, the presence of worms induced a considerable and significant decline of Pb bioaccessibility as evidenced at the end of the exposure period compared to the levels obtained at the beginning or at the end but without earthworms (Fig. 2.2a and Table 2.3). The opposite phenomenon was observed in RacFor2002 where the final bioaccessible Pb concentration was significantly higher in the presence of worms than without worms and matched the

initial values (Fig. 2.2b and Table 2.3). However, final bioaccessible Pb levels remained within a relatively low-value range (*i.e.*, $<2 \text{ mg kg}^{-1}$) both for RDDC2004 and RacFor2002. In both soils, bioaccessible Pb was consistently and strongly correlated with total soil concentration, except for the values at $t = 56$ with worms in RDDC2004. Pairwise correlation coefficients ($p < 0.05$) in RDDC2004 were 0.997, 0.26 and 0.95 for $t = 0$; $t = 56$ with earthworms and $t = 56$ without earthworms respectively. In RacFor2002, corresponding Spearman's ρ values were 0.90, 0.88 and 0.91, respectively, for the same conditions.

HMX was generally more readily extractable in the RDDC2004 soil than in the RacFor2002, except for the highest concentration where soluble HMX concentration was inferior in RDDC2004 (Fig. 2.3a, b and Table 2.3). This phenomenon was very likely due to the HMX aqueous solubility limit being reached between the two highest treatments (15 and 150 mg kg^{-1} , nominal) in RDDC2004 as the concentrations in the KNO_3 extracts of the 150 mg kg^{-1} treatment were comparable in RDDC2004 and RacFor2002. However, the HMX spikes crescendo was also observed here. This difference in chemical accessibility was also reflected in the hydrosoluble fractions of soil HMX and K_d up to $15 \text{ mg HMX kg}^{-1}$ (Table 2.3). Unlike Pb, presumably bioaccessible HMX did not vary significantly during the exposure period aside from the two highest concentrations in RDDC2004 (Fig. 2.3a) and the highest one in RacFor2002 (Fig. 2.3b) where HMX was slightly less soluble at $t = 56$. Likewise, HMX accessibility in soil was not influenced by the occurrence

of earthworms both for RDDC2004 and RacFor2002 (Fig. 2.3a, b and Table 2.3). All those statements were further substantiated by the profiles of soluble HMX proportions in soil and K_d (Table 2.3). Alike Pb, soluble HMX was consistently and strongly correlated with total soil concentrations and in both soils. Pairwise correlation coefficients ($p < 0.05$) in RDDC2004 were 0.94, 0.94 and 0.91, respectively, at $t = 0$; $t = 56$ with earthworms and $t = 56$ without earthworms. In RacFor2002, corresponding values were 0.98, 0.98 and 0.98, respectively.

1.4.4 Comparative toxicity of Pb and HMX in the RDDC2004 and the RacFor2002 soils

Toxicity data for Pb and HMX in the two soils tested are summarized in Table 2.4. In the RacFor2002 soil, Pb was neither lethal nor did it significantly affect adult body weight whereas it exerted significant lethality and body weight loss in the RDDC2004 soil (data not shown). HMX was not lethal at any exposure level but reduced significantly the body weight from 4.6 mg kg^{-1} for RDDC2004 but only at the highest dose in RacFor2002 (results not presented).

Reproduction was impacted in both substrates but differently. The number of juveniles and cocoons are generally among the most sensitive reproduction endpoints (Robidoux et al., 2001). Therefore, in this study only the number of juveniles as well as the number of total and hatched cocoons are reported. Total number of cocoons was chosen as a representative endpoint as it demonstrated to be sensitive and that

usual reproduction parameters are interrelated (Robidoux et al., 2000, 2001, 2002; Savard et al., 2007). Lead decreased significantly all three endpoints in RDDC2004 at low concentration ($>57 \text{ mg kg}^{-1}$; Fig. 2.4) whereas in RacFor2002, a significant effect on reproduction was reported only at the highest concentration (1533 mg kg^{-1} ; Savard et al., 2007). The EC_{50} for cocoon production (as total number of cocoons) in RDDC2004 was about 13 times lower than in RacFor2002 (Table 2.4). HMX also impaired reproduction in both soils. It had a significant negative effect on all three parameters at the two highest concentrations in RDDC2004 (Fig. 2.5). In RacFor2002, reproduction was significantly impaired at the highest concentration only (Savard et al., 2007). The HMX EC_{50} for cocoon production (as total number of cocoons) in RDDC2004 was about 3.4 times lower than in RacFor2002 (Table 2.4).

1.5 Discussion

1.5.1 Soil profiles and impact of earthworms on pH

The two selected soils, although both primary sandy, presented contrasting profiles. The most outstanding differences are that RDDC2004 is significantly more acidic and less organic as well as less rich in specific adsorption constituents than RacFor2002. As a result, RDDC2004 will be less prone to retain compounds on its solid phase especially metals. Toxicant partitioning and solubility in soil solution is actually proven to be controlled by soil physico-chemical parameters like pH,

organic matter or clay content which determine general sorption potential (Sauvé, 2002; Rieuwerts et al., 2006). These features outline a difference in bioaccessibility between the two soils, which is the point meant to be investigated.

The marked pH progression evidenced in RDDC2004 after introducing the worms is in agreement with the observations of Ma et al. (2002) and Wen et al. (2004, 2006). Also, Udovic and Lestan (2007) and Udovic et al. (2007) observed a pH increase in *E. fetida* casts produced in a non-remediated Pb, Zn-contaminated soil and in a EDTA-remediated soil contaminated with Cd, Pb and Zn respectively. However, the increases reported by those studies are not as substantial as in our study where the soil pH was neutralized (increased up to three pH units). This difference in the magnitude of increase may be due to soil specificities. The present results support the conclusions of the previous authors stating that earthworm bioturbation is responsible for the pH variation since no such rise was noted in jars deprived of organisms. Earthworms modify various properties of ingested soil during their feeding process, including the pH, which is maintained in a neutral range even if the bulk soil pH is below 6.0 (Edwards and Bohlen, 1996). It has been postulated that earthworms raise soil pH through release of nitrogen-rich excreta like their alkaline urine (Salmon, 2001). An alternative or complementary mechanism might be the production of calcium compounds by calciferous glands (Lee, 1985). This latter hypothesis is supported by the findings of Udovic et al. (2007) who evidenced an enrichment in Ca of earthworm casts, including *E. fetida*. This dynamic process

modulates very likely soil pH and consequently availability of contaminants such as metals because its essential function in the distribution of substances between phases is well acknowledged (Janssen et al., 1997a; Rieuwerts et al., 1998). Conversely, soil pH was not affected by earthworm occurrence in RacFor2002. However, initial pH of this soil is in the range 7-8 and *Eisenia fetida* was actually reported to have this interval as optimum although it can tolerate a wider pH range (Edwards and Bohlen, 1996). This may explain the notable pH rise to reach the eco-physiological optimum recorded in RDDC2004 but not RacFor2002. It should also be pointed out that the Heilongjiang soil (Wen et al., 2004) and the Heilongjiang and Changzhi soils (Wen et al., 2006) with the highest initial pHs experienced the smallest increase. Besides, Cheng and Wong (2002) observed either no change or a pH decrease in the same soil as one of those tested by Wen et al. (2004, 2006) but amended with Zn. It was argued that this discrepancy between the results may be attributed to a Zn-mediated adsorption process and/or to the different worm test species. These data along with ours show that earthworm activity generally increases soil pH (particularly when acidic) but the amplitude of this rise and its occurrence seem dependant on soil and contaminant type as well as the earthworm species. This earthworm-determined soil pH modulation has obviously implications for metal mobility and bioavailability to soil biota (Udovic and Lestan, 2007).

1.5.2 Bioaccessibility of Pb, HMX availability and the effect of worms in two soils

Weak neutral salt extraction applied in this study is a relevant and common technique to determine the bioaccessible (or exchangeable) pool of metals in soils (Gupta et al., 1996; Houba et al., 1996; Conder and Lanno, 2000; Menzies et al., 2007). In addition to that, it has been demonstrated that the soil solution/dermal route is predominant for contaminant uptake in earthworms, particularly for metals (Vijver et al., 2003; Scott-Fordsmand et al., 2004) but also for organic chemicals with low lipophilicity (*i.e.*, $\log K_{ow} < 5$; Belfroid et al., 1995; Jager et al., 2003). HMX, which has a low $\log K_{ow}$ of 0.06–0.26 falls under this latter category (Talmage et al., 1999; Monteil-Rivera et al., 2003). Moreover, soil water extracts have also been used to assess mobile and available HMX fraction to worms (Kuperman et al., 2003; Simini et al., 2003; Robidoux et al., 2004b).

As expected, initial Pb bioaccessibility was substantially higher in RDDC2004 than in RacFor2002. This outcome reflects the nature of soils in the way that it is corroborated by the respective levels of physico-chemical characteristics upon which soil Pb solubility is demonstrated to depend, with pH as the primary and universal variable (Zimdahl and Skogerboe, 1977; Janssen et al., 1997a; Rieuwerts et al., 1998, 2006; Sauvé et al., 1997, 2000). Similarly, apart from bulk metal concentrations, metal concentrations in soil solution reported in the study of Nahmani et al. (2007) on several field-contaminated metalliferous soils seem to be correlated with soil properties. Besides, Rooney et al. (2007) observed that soil solution Pb concentration

decreased with elevating soil pH in two soils experimentally contaminated with recreational Pb shot and adjusted at different pHs. Those findings are particularly relevant to soils of military areas because many of those soils are predominantly sandy with low pH, like the RDDC2004. It implies that Pb mobility and bioavailability in these soils is likely to be high. The discrepancy in Pb solubility may also be partly attributed to the different extraction solid:solution ratio used for respective soil as shown with other metals by Yin et al. (2002). Yet, the data of the latter authors indicate that this artefact is unlikely to account for the whole difference and Jopony and Young (1994) observed only a marginal effect of this ratio (notably up to 1:10) on Pb extractability. Therefore, the difference in Pb bioaccessibility evidenced here is genuine and imputable to soil type and coincide with differential soil Pb toxicity to earthworms. In both soils, Pb bioaccessibility was also found to change over time in presence of earthworms but in opposed directions. Pb bioaccessibility declined drastically in RDDC2004 in parallel to the pH rise whereas it increased slightly but significantly in RacFor2002. The decrease of Pb availability in RDDC2004 is certainly driven by the pH elevation as pH is the major solubility-controlling factor and as earthworm gut conditions have already been pointed out to modify the mobility of metals due to pH change (Weltje, 1998). This evolution is contrary to the observations of Wen et al. (2004, 2006) who reported an increase of metal availability in soils due to earthworm activity. However, our observations are in agreement with the findings of Zorn et al. (2005) who evidenced an increase in Zn

availability due to bioturbation by *A. caliginosa* exposed to a Zn-polluted soil layer. The divergence between our results and those reported by Wen et al. (2004, 2006) may be explained by the larger pH rise (up to three pH units) experienced here which probably overcame the solubilizing impact of the worms. It remains that this fluctuation in Pb bioaccessibility is caused by a pH-mediated earthworm effect. The lack of correlation with total soil Pb in presence of worms further attests this phenomenon. In the same way, it is interesting to stress that final Pb bioaccessibility in RDDC2004 was within the same range of initial Pb bioaccessibility in RacFor2002 with a pH of 7.2. The reverse situation prevailing in RacFor2002 was similar to that described by Wen et al. (2004, 2006). It is also congruent with the observations of Udovic and Lestan (2007) who reported a 11-fold increase of the water soluble Pb fraction in *E. fetida* casts produced in non-remediated soil. Another corroboration of these results is the conclusion of Udovic et al. (2007) that *E. fetida* activity neutralized the effect of the EDTA-leaching procedure of the soil, intended to reduce metal mobility and hence availability. Wen et al. (2004, 2006) hypothesized that earthworm increased metal solubility by producing metal-chelating metallophores. They observed also an increase of dissolved organic carbon (DOC) resulting from earthworm activity and soil Pb solubility is precisely known to be influenced by organic matter (Zimdahl and Skogerboe, 1977; McBride et al., 1997; Tipping et al., 2003; Rieuwerts et al, 2006). Additionally, Sauvé et al. (1998) determined that in the 6.5-8 pH range (comprising the pH of RacFor2002), higher pH

promotes the formation and dissolution of organo-Pb complexes, thereby increasing Pb solubility. This phenomenon is probably responsible to some degree of the rise in Pb solubility seen here and in Wen et al. (2004). As for pH, the divergence in Pb availability evolution pattern between RDDC2004 and RacFor2002 can be explained by the different soil characteristics (Udovic and Lestan, 2007).

HMX proved to be fairly extractable in both soils, although being poorly water soluble and relatively refractory to desorption from soils (Talmage et al., 1999; Monteil-Rivera et al., 2003; Hatzinger et al., 2004). Nevertheless, the low sorption potential (K_d^S) along with the low solubility determined for HMX indicates that it will be weakly retained by soils but relatively persistent in the soil surface layer (Monteil-Rivera et al., 2003). However, HMX appeared also more available in RDDC2004 than RacFor2002. As pointed out earlier, sorption of HMX in soils and hence availability is mainly regulated by clay proportion and almost not by soil organic matter (Monteil-Rivera et al., 2003). The slightly higher clay content in RacFor2002 may therefore explain the higher accessibility in RDDC2004 except at the most elevated treatment (150 mg kg^{-1} nominal). An artefact presumably generated by the HMX solubility limit being reached between the two highest concentrations in RDDC2004 is likely to account for the inverse occurrence recorded at 150 mg kg^{-1} . This occurrence constitutes a limitation of the bioaccessibility assessment method concerning HMX. The water-soluble HMX concentrations measured in RDDC2004 were higher than in similar studies (Kuperman et al., 2003;

Simini et al., 2003). This may be elucidated by the higher clay level in the soil used in those papers. The lower HMX accessibility noted at $t = 56$ (with and without worms) for the two highest treatments in RDDC2004 and the highest one in RacFor2002 compared to $t = 0$ levels may result from an increase of HMX sorption to the soil in the course of exposure. As HMX was freshly added to the soils in order to prevent possible degradation, HMX molecules have probably not had enough time to reach a steady-state equilibrium with soil for the abovementioned treatments. Unlike Pb, no incidence of earthworm on chemically accessible HMX was identified in any soil. The effect of earthworms is principally pH and organic matter-mediated but it can be postulated that HMX, as a poorly hydrosoluble organic compound, may be relatively unaffected by pH and is demonstrated to be unaffected by organic matter. The modification of HMX availability by soil physico-chemical properties may be one of the explanations for the lack of correlation between the biological effects and total HMX concentrations reported in Robidoux et al. (2004b).

1.5.3 Comparative toxicity of Pb and HMX in two soils with contrasting profiles

The test doses for Pb and HMX were selected to be environmentally relevant to concentrations found in the field (Morgan and Morgan, 1988; Spurgeon and Hopkin, 1995; Kennette et al., 2002; Spurgeon et al., 2005; Nahmani et al., 2007) and specifically on military training areas. In that respect, the concentration ranges were encompassed by those determined in soils of several Canadian (Marois et al., 2004;

Thiboutot et al., 2004) or Swedish bases (Wingfors et al., 2006). Pb toxicity contrasted widely between the two assayed soils, Pb being much less toxic in RacFor2002 (Table 2.4). Pb LC₅₀s and growth EC₅₀s documented in the literature are generally superior to the ones determined here (Neuhauser et al., 1985; Spurgeon et al., 1994; Spurgeon and Hopkin, 1995; Davies et al., 2003a, 2003b; Langdon et al., 2005; Inouye et al., 2006). This discrepancy is probably soil-related as many of those surveys used artificial OECD soil or other soils that are different from the soils investigated in the present article. Such influence of soil type (*i.e.*, physico-chemical characteristics) on toxicity has already been demonstrated in previous studies for Pb and other chemicals (Bengtsson et al., 1986; Van Gestel and Van Dis, 1988; Spurgeon and Hopkin, 1995, 1996; Lock and Janssen, 2001; Bradham et al., 2006; Nahmani et al., 2007). As for HMX, it was observed to be non-lethal in both soils. This is consistent with results of other studies with *Eisenia* sp. (Robidoux et al., 2001, 2002; Simini et al., 2003), with Enchytraeids (Kuperman et al., 2003; Dodard et al., 2005) or on aquatic invertebrates (Lotufo et al., 2001; Steevens et al., 2002). HMX reduced however growth in both soils but to a much smaller extent in the organic RacFor2002 soil (Table 2.4). Robidoux et al. (2001, 2002) also noted weight loss after exposure to HMX with EC₅₀ <280 mg kg⁻¹ and 106 mg kg⁻¹ in spiked artificial OECD soil and natural forest soil (which was similar to RacFor2002 except for organic matter content: 3.8%, respectively). Thus, the magnitude of growth

alteration by HMX was lowest in RacFor2002 followed by the forest soil tested in Robidoux et al. (2002) and lastly RDDC2004.

Reproduction of earthworms was affected by both substances but to different degrees in the two soils. Our data show that sensitivity of three main endpoints (number of juveniles, total cocoon production and number of hatched cocoons) was comparable. Concerning Pb, reproduction impairment varied considerably between the two soils, RDDC2004 being consistently more toxic than the organic RacFor2002 (Table 2.4). The reproductive toxicity observed with RDDC2004 is more severe than usually reported in the literature while it is similar in RacFor2002 (Neuhauser et al., 1984; Spurgeon et al., 1994; Spurgeon and Hopkin, 1995; Davies et al., 2003b; Inouye et al., 2006). Such fluctuation of contaminant-induced reproduction impairment with soil type/properties (notably pH) has already been described for Pb and other metals, both in soils experimentally amended with metals and field-contaminated soils (Bengtsson et al., 1986; Spurgeon and Hopkin, 1995, 1996; Bradham et al., 2006; Feisthauer et al., 2006; Spurgeon et al., 2006; Nahmani et al., 2007). Bradham et al. (2006) even derived equations predicting toxicity in different soils of the same Pb dose (2000 mg kg^{-1}) for standard endpoints, including reproduction from soil physico-chemical parameters. They determined that reproduction was correlated positively directly and/or indirectly to the amount of Fe and Al amorphous oxides, pH, CEC and organic carbon level (in order of decreasing importance). Nahmani et al. (2007) also presented such models but in soils

contaminated with a range of metals. They found that cocoon production in *E. fetida* was positively correlated by simple regression with soil pH and soil solution DOC as well as with several metals in soil solution, including Pb. The models obtained in those two studies support our data with a range of Pb concentrations inasmuch as RDDC2004 has a lower $\text{Fe}_{\text{ox}}\text{-Al}_{\text{ox}}$ content, pH, CEC and TOC than RacFor2002, thereby elucidating the toxicity shift between the two soils. Pb is indeed known to be complexed by organic matter and metal oxides (Zimdahl and Skogerboe, 1977).

HMX exerted adverse effects on reproduction in both soils as well but with a shift between the responses here again (Table 2.4). The results of this study are in agreement with previous investigations (Robidoux et al., 2001, 2002; Simini et al., 2003). Derived EC_{50} for cocoon production with current data is very close to that of Simini et al. (2003); 9.1 vs. 8.5 mg kg^{-1} in freshly spiked Sassafras Sandy Loam (SSL) soil (analogous to RDDC2004) and appears also comparable to that of Robidoux et al. (2002; $<15.6 \text{ mg kg}^{-1}$) in a forest soil. However, it is not possible to establish if the EC_{50} from the present study is different from that obtained by Robidoux et al. (2001) in artificial OECD soil ($<280 \text{ mg kg}^{-1}$) due to the distinct concentration sets tested. Also, even if no definitive difference can be established between the EC_{50} s of Robidoux et al. (2001, 2002), the higher value in the OECD soil seems to indicate lower HMX toxicity and possibly bioavailability in the OECD substrate. This hypothesis is supported by our results suggesting a difference in HMX bioavailability between the two soils. In that view, Monteil-Rivera et al.

(2003) found that sorption of HMX in soils is essentially governed by clay content but rather insensitive to organic matter level. The clay proportion in the compared soils follows the sequence RDDC2004 < RacFor2002 < forest soil (Robidoux et al., 2002) < SSL (Simini et al., 2003). HMX bioavailability and toxicity may consequently be expected to follow a reverse decreasing pattern. This is corroborated by the toxicities generated in the two soils of this paper. Despite the difference in clay content, the reproductive toxicity of HMX in the RDDC2004 and SSL soils is similar but, in opposition to the Pb experiment, HMX toxicity was assessed in freshly amended soils to prevent potential degradation. This factor may account for this outcome, all the more that Simini et al. (2003) examined also the toxicity of HMX in the same soil at identical concentrations but after 3 months weathering/aging and the resulting toxicity was much lower than in the freshly spiked soil. Thus, divergences in HMX toxicity to reproduction caused by soil properties (*i.e.*, clay content) may have been shaded by the fact that HMX was not in sorption equilibrium with the RDDC2004 soil.

HMX toxicity and associated bioavailability seemed less affected by soil type than Pb in this study. This may not be unexpected as the amplitude of variation of the various parameters known to affect Pb bioaccessibility (pH, sorption components) between the two soils of this study is larger than the difference in clay content. However, it should be noted that the bioaccessibility patterns in the two soils were consistent with the toxicity data, both for Pb and HMX. On the other hand, total Pb

or HMX concentrations in soils did not provide good indications about the potential toxicity of the soils, especially for Pb. This concurs with the findings of Ragnvaldsson et al. (2007) who observed that the cytotoxicity of the *in situ* contaminated soils they investigated was better correlated to metal concentrations in soil aqueous extracts than to total soil concentrations.

1.6 Conclusion

Our results showed that Pb and HMX were more bioavailable and accessible to earthworms in the sandy, acidic and organic matter-poor soil than in the organic forest soil. This was reflected by the shift of toxicity and the difference in contaminant bioaccessibility recorded between the two soils. Contaminant bioaccessibility therefore seems to be a good predictor of toxicity in natural soils amended with a single toxicant. The behaviour of Pb was more impacted by soil type than the behaviour of HMX. It was also shown that variations in Pb bioavailability were as expected primarily pH-driven. The presence of worms in the soil modified the bioaccessibility of Pb but not the chemical accessibility of HMX. However, the effect was different in the two soils. In the sandy, acidic, low OM content soil taken from the military RTA, Pb bioaccessibility declined in the presence of earthworms likely as a result of pH raise instigated by the organisms whereas it was the opposite in the forest soil probably due to augmented dissolved organic matter.

Toxicant bioavailability in soils is an essential factor. This study shows that it should notably be considered for risk assessment and in environmental quality surveys of soils from military zones, given that soil type may vary and that the bioavailability issue is even more important for field-contaminated soils. As organisms may influence bioavailability, a joint approach involving both chemical and biological indicators is recommended. However, as advocated by Nahmani et al. (2007), results from studies with toxicant-amended natural soils are of limited value with respect to extrapolation of bioavailability and toxicity in field multi-contaminated soils because the bioavailability conditions in those experiments are mostly unrealistic. As a result, further work involving field soils with multiple contamination is required to adequately elucidate contaminant bioavailability and associated risks in soils impacted by military activities.

1.7 Acknowledgements

We thank Drs. Sébastien Sauvé and Carmen Donisa from the Department of Analytical Chemistry at Université de Montréal for analytical support with metals. Gratitude is also expressed to Louise Paquet and Dr. Fanny Monteil-Rivera from the Environmental Chemistry Group as well as Manon Sarrazin from the Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute – National Research Council of Canada for technical assistance and scientific advice concerning energetic compounds. We are also grateful to Université du Québec à Montréal for the

doctoral fellowships awarded to Yann Berthelot and to Drs. Sonia Thiboutot and Guy Ampleman from Defence Research and Development Canada – Valcartier (Canadian Ministry of National Defence) for their support of this project.

1.8 References

- Allen, H.E., 2002. Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants. SETAC, Pensacola, FL, USA.
- Baveye, P., Bladon, R., 1999. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment: A critical perspective. In: Baveye, P., Block, J.C., Goncharuk, V.V. (Eds.). Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment: Practical Consequences for the Environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 227-248.
- Belfroid, A., Seinen, W., van Gestel, K., Hermens, J., van Leeuwen, K., 1995. Modelling the accumulation of hydrophobic organic chemicals in earthworms: Application of the equilibrium partitioning theory. Environ. Sci. Pollut. R. 2, 5-15.
- Bengtsson, G., Gunnardsson, T., Rundgren, S., 1986. Effects of metal pollution on the earthworm *Dendrobaena rubida* (Sav.) in acidified soils. Water Air Soil Pollut. 28, 361-383.
- Berthelot, Y., Valton, E., Auroy, A., Trottier, B., Robidoux, P.Y., 2008. Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.056.

- Bradham, K.D., Dayton, E.A., Basta, N.T., Schroder, J., Payton, M., Lanno, R.P.,
2006. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to
earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 769-775.
- Cheng, J., Wong, M.H., 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils.
Biol. Fert. Soils. 36, 72-78.
- Conder, J.M., Lanno, R.P., 2000. Evaluation of surrogate measures of cadmium,
lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere.* 41, 1659-1668.
- Davies, N.A., Hodson, M.E.; Black, S., 2003a. The influence of time on lead toxicity
and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test.
Environ. Pollut. 121, 55-61.
- Davies, N.A., Hodson, M.E., Black, S., 2003b. Is the OECD acute worm toxicity test
environmentally relevant? The effect of mineral form on calculated lead
toxicity. *Environ. Pollut.* 121, 49-54.
- Dodard, S.G., Sunahara, G.I., Kuperman, R.G., Sarrazin, M., Gong, P., Ampleman,
G., Thiboutot, S., Hawari, J., 2005. Survival and reproduction of enchytraeid
worms, Oligochaeta, in different soil types amended with energetic cyclic
nitramines. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2579-2587.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. Biology and ecology of earthworms, Third
edition. Chapman and Hall, London, UK.
- Efroymson, R.A., Will, M.E., Suter II, G.W., 1997. Toxicological benchmarks for
contaminants of potential concern for effects on soil and litter invertebrates

- and heterotrophic process: 1997 revision. Oak Ridge National Laboratory Report ES/ER/TM-126/R2, 151p.
- Feisthauer, N.C., Stephenson, G.L., Princz, J.I., Scroggins, R.P., 2006. Effects of metal-contaminated forest soils from the Canadian shield to terrestrial organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 823-835.
- Gupta, S.K., Vollmer, M.K., Krebs, R., 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *Sci. Tot. Environ.* 178, 11-20.
- Hatzinger, P.B., Fuller, M.E., Rungmakol, D., Schuster, R.L., Steffan, R.J., 2004. Enhancing the attenuation of explosives in surface soils at military facilities: sorption-desorption isotherms. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 306-312.
- Houba, V.J.G., Lexmond, Th.M., Novozamsky, I., van der Lee, J.J., 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci. Tot. Environ.* 178, 21-28.
- Hund-Rinke, K., Kördel, W., 2003. Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 52-62.
- Inouye, L.S., Jones, R.P., Bednar, A.J., 2006. Tungsten effects on survival, growth, and reproduction in the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 763-768.
- International Organization for Standardization (ISO), 1994. Soil quality: determination of pH. ISO 103390, International Standard. ISO, Geneva.

- International Organization for Standardization (ISO), 1998. Soil quality: effects of soil pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: determination of effects on reproduction. ISO 11268-2, International Standard. ISO, Geneva.
- Jager, T., Fleuren, R.H.L.J., Hogendoorn, E.A., De Korte, G., 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37, 3399-3404.
- Janssen, R.P.T., Posthuma, L., Baerselman, R., Den Hollander, H.A., van Veen, R.P.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 1997a. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. I. Relationships between metal partition coefficients and soil characteristics. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2470-2478.
- Johnson, C.A., Moench, H., Wersin, P., Kugler, P., Wenger, C., 2005. Solubility of antimony and other elements in samples taken from shooting ranges. J. Environ. Qual. 34, 248-254.
- Jopony, M., Young, S.D., 1994. The solid-solution equilibria of lead and cadmium in polluted soils. Eur. J. Soil Sci. 45, 59-70.
- Kennette, D., Hendershot, W., Tomlin, A., Sauvé, S., 2002. Uptake of trace metals by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in urban contaminated soils. Appl. Soil Ecol. 19, 191-198.
- Kula, H., Heimbach, U., 1998. Reproducibility in soil toxicity testing. In Løkke, H., van Gestel, C.A.M. (Eds.), Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests. John Wiley, Weinheim, Germany, pp. 31-40.

- Kuperman, R.G., Checkai R.T., Simini, M., Phillips, C.T., Kolakowski, J.E., Curnas, C.W., Sunahara, G.I., 2003. Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia*. 47, 651-656.
- Langdon, C.J., Hodson, M.E., Arnold, R.E., Black, S., 2005. Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. *Environ. Pollut.* 138, 68-375.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 39-47.
- Lee, K.E., 1985. *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, Sydney, Australia.
- Lock, K., Janssen, C.R., 2001. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting the bioavailability into account. *Ecotoxicology*. 10, 315-322.
- Lotufo, G.R., Farrar, D., Inouye, L.S., Bridges, T.S., Ringelberg, D.B., 2001. Toxicity of sediment-associated nitroaromatic and cyclonitramine compounds to benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1762-1771.

- Ma, L.Q., Hardison Jr, D.W., Harris, W.G., Cao, X., Zhou, Q., 2007. Effect of soil property and soil amendment on weathering of abraded metallic Pb in shooting ranges. *Water Air Soil Pollut.* 178, 297–307.
- Ma, W., Edelman, T., van Beersum, I., Jans, T., 1983. Uptake of cadmium, zinc, lead, copper by earthworms near a zinc-smelting complex: influence of soil pH and organic matter. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 424-427.
- Ma, W.C., 1982. The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metals in earthworms. *Pedobiologia.* 24, 109-119.
- Ma, Y., Dickinson, N.M., Wong, M.H., 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. *Biol. Fert. Soils.* 36, 79-86.
- Marois, A., Gagnon, A., Thiboutot, S., Ampleman, G., Bouchard, M., 2004. Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînement, Base des Forces canadiennes, Valcartier. Defence Research and Development Canada Valcartier, Department of National Defence Canada. TR 2004-206, 78 p.
- McBride, M., Sauvé, S., Hendershot, W., 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *Eur. J. Soil Sci.* 48, 337-346.
- Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environ. Pollut.* 145, 121-130.

- Monteil-Rivera, F., Groom, C., Hawari, J., 2003. Sorption and degradation of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in soil. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3878-3884.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1988. Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environ. Pollut.* 54, 123-138.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environ. Pollut.* 149, 44-58.
- Neuhauser, E.F., Malecki, M.R., Loehr, R.C., 1984. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to sublethal concentrations of metals. *Pedobiologia.* 27, 89-97.
- Neuhauser, E.F., Loehr, R.C., Milligan, D.L., Malecki, M.R., 1985. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biol. Fert. Soils.* 1, 149-152.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 63-77.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P., Allen, H.E., 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 163-172.

- Ragnvaldsson, D., Berglind, R., Tysklind, M., Leffler, P., 2007. Environmental hazard screening of a metal-polluted site using pressurized liquid extraction and two in vitro bioassays. *Ambio*. 36, 494-501.
- Renoux, A.Y., Sarrazin, M., Hawari, J., Sunahara, G.I., 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in soil in the presence of the earthworm *Eisenia andrei*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1473-1480.
- Rieuwerts, J.S., Thornton, I., Farago, M.E., Ashmore, M.R., 1998. Quantifying the influence of soil properties on the solubility of metals by predictive modelling of secondary data. *Chemical Speciation and Bioavailability*. 10, 83-94.
- Rieuwerts, J.S., Ashmore, M.R., Farago, M.E., Thornton, I., 2006. The influence of soil characteristics on the extractability of Cd, Pb and Zn in upland and moorland soils. *Sci. Tot. Environ.* 366, 864-875.
- Robidoux, P.Y., Svendsen, C., Caumartin, J., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Weeks, J.M., Sunahara, G.I., 2000. Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1764-1773.
- Robidoux, P.Y., Hawari, J., Thiboutot, S., Sunahara, G.I., 2001. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ. Pollut.* 111, 283-292.
- Robidoux, P.Y., Hawari, J., Bardai, G., Paquet, L., Ampleman, G., Thiboutot, S., Sunahara, G.I., 2002. TNT, RDX and HMX decrease earthworm (*Eisenia*

- andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 43, 379-388.
- Robidoux, P.Y., Sunahara, G.I., Savard, K., Berthelot, Y., Dodard, S., Martel, M., Gong, P., Hawari, J., 2004a. Acute and chronic toxicity of the new explosive CL-20 to the earthworm (*Eisenia andrei*) exposed to amended natural soils. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1026-1034.
- Robidoux, P.Y., Gong, P., Sarrazin, M., Bardai, G., Paquet, L., Hawari, J., Dubois, C., Sunahara, G.I., 2004b. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 300-313.
- Rooney, C.P., McLaren, R.G., Condon, L.M., 2007. Control of lead solubility in soil contaminated with lead shot: Effect of soil pH. Environ. Pollut. 149, 149-157.
- Salmon, S., 2001. Earthworm excreta (mucus and urine) affect the distribution of springtails in forest soils. Biol. Fert. Soils. 34, 304-310.
- Sauvé, S., McBride, M., Hendershot, W., 1997. Speciation of lead in contaminated soils. Environ. Pollut. 98, 149-155.
- Sauvé, S., McBride, M., Hendershot, W., 1998. Soil solution speciation of lead (II): effect of organic matter and pH. Soil Sci. Soc. Am. J. 62, 618-621.
- Sauvé, S., Hendershot, W.A., Allen, H.E., 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden and organic matter. Environ. Sci. Technol. 34, 1125-1131.

- Sauvé, S., 2002. Speciation of metals in soils. In Allen, H.E. (Ed.), Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp. 7-37.
- Savard, K., Berthelot, Y., Auroy, A., Spear, P., Trottier, B., Robidoux, P.Y., 2007. Effects of HMX-lead mixtures on reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53, 351-358.
- Scott-Fordsmand, J.J., Stevens, D., McLaughlin, M., 2004. Do earthworms mobilize fixed zinc from ingested soil? Environ. Sci. Technol. 38, 3036-3039.
- Simini, M., Checkai, R.T., Kuperman, R.G., Phillips, C.T., Kolakowski, J.E., Kurnas, C.W., Sunahara, G.I., 2003. Reproduction and survival of *Eisenia fetida* in a sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia. 47, 657-662.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1995. Extrapolation of the laboratory based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. Ecotoxicology. 4, 190-205.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996. Effect of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. Pedobiologia. 40, 80-96.
- Spurgeon, D.J., Hopkins, S.P., Jones, D.T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida*

- (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 84, 123-130.
- Spurgeon, D.J., Ricketts, H., Svendsen, C., Morgan, A.J., Kille, P., 2005. Hierarchical responses of soil invertebrates (earthworms) to toxic metal stress. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5327-5334.
- Spurgeon, D.J., Lofts, S., Hankard, P.K., Toal, M., McLellan, D., Fishwick, S., Svendsen, C., 2006. Effect of pH on metal speciation and resulting metal uptake and toxicity for earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 788-796.
- Steevens, J.A., Duke, B.M., Lotufo, G.R., Bridges, T.S., 2002. Toxicity of the explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in sediments to *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*: low-dose hormesis and high-dose mortality. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1475-1482.
- Talmage, S.S., Opresko, D.M., Maxwell, C.J., Welsh, C.J.E., Cretella, F.M., Reno, P.H., Daniel, F.B., 1999. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 161, 1-156.
- Thiboutot, S., Ampleman, G., Marois, A., Gagnon, A., Bouchard, M., Hewitt, A., Jenkins, T.F., Walsh, M.E., Bjella, K., Ramsey, C., Ranney T.A., 2004. Environmental conditions of surface soils, CFB Gagetown training area: delineation of the presence of munitions related residues (phase III, final

report). Defence Research and Development Canada Valcartier, Department of National Defence Canada. TR 2004-205, 59 p.

Tipping, E., Rieuwerts, J., Pan, G., Ashmore, M.R., Lofts, S., Hill, M.T.R., 2003.

The solid-solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) in upland soils of England and Wales. *Environ. Pollut.* 125, 213-225.

Tomson, M.B., Allen, H.E., English, C.W., Lyman, W.J., Pignatello, J.J., 2003.

Contaminant-soil interactions. In Lanno, R.P. (Ed.), *Contaminated Soils: From Soil-Chemical Interactions to Ecosystem Management*. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp. 251-290.

Udovic, M., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the fractionation and

bioavailability of heavy metals before and after remediation. *Environ. Pollut.* 148, 663-668.

Udovic, M., Plavc, Z., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the

fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere* 70, 126-134.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 1997. Method 8330:

Nitroaromatics and nitramines by high performance liquid chromatography (HPLC). In *Test Methods for Evaluating Solid Waste*. SW-846. Update III,

Part 4:1 (B). Office of Solid Waste, Washington, DC. Available from:

<<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8330a.pdf>>.

- Van Gestel, C.A.M., van Dis, W.A., 1988. The influence of soil characteristics on the toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta). Biol. Fert. Soils. 6, 262-265.
- Van Gestel, C.A.M., Weeks, J.M., 2004. Recommendations of the 3rd international workshop on earthworm ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001. Ecotoxicol. Environ. Saf. 57, 100-105.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., van Gestel, C.A.M., 2003. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. Soil Biol. Biochem. 35, 125-132.
- Weltje, L., 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. Chemosphere 36, 2643-2660.
- Wen, B., Hu, X., Liu, Y., Wang, W., 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. Biol. Fert. Soils. 40, 181-187.
- Wen, B., Liu, Y., Hu, X., Shan, X., 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. Chemosphere. 63, 1179-1186.
- Wingfors, H., Edlund, C., Hägglund, L., Waleij, A., Sjöström, J., Karlsson, R-M., Leffler, P., Qvarfort, U., Ahlberg, M., Thiboutot, S., Ampleman, G., Martel, R., Duvalois, W., Creemers, A., van Ham, N., 2006. Evaluation of the

- contamination by explosives and metals in soils at the Älvdalen shooting range. Part II: Results and Discussion. FOI-Swedish Defence Research Agency, NBC Defence, Umeå, Sweden. Report FOI-R-1877-SE, 47 p.
- Yin, Y., Impellitteri, C.A., You, S.J., Allen, H.E., 2002. The importance of organic matter distribution and extract soil/solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *Sci. Tot. Environ.* 287, 107-119.
- Yinon, J., 1990. Toxicity and metabolism of explosives. CRC Press, Boston, MA, USA.
- Zimdahl, R.L., Skogerboe, R.K., 1977. Behaviour of lead in soil. *Environ. Sci. Technol.* 11, 1202-1207.
- Zorn, M.I., van Gestel, C.A.M., Eijsackers, H., 2005. The effect of two endogeic earthworm species on zinc distribution and availability in artificial soil columns. *Soil Biol. Biochem.* 37, 917-925.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 2.1. Evolution of mean soil pH throughout test period in the presence of worms in RDDC2004 (error bars: \pm SD, $n = 4$). Within each treatment group, means sharing the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p < 0.05$).

Fig. 2.2. (a) Mean soil bioaccessible Pb levels in RDDC2004 throughout the test period in the presence and absence of *E. andrei* (error bars: \pm SD, $n = 3$). The asterisk (*) indicates a significant difference from the control (Dunnett's test, $p < 0.05$). Within each treatment group, means sharing the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p < 0.05$).

(b) Mean soil bioaccessible Pb levels in RacFor2002 throughout the test period in the presence and absence of *E. andrei* (error bars: \pm SD, $n = 3$). The asterisk (*) indicates a significant difference from the control (Dunnett's test, $p < 0.05$). Within each treatment group, means sharing the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p < 0.05$).

Fig. 2.3. (a) Mean soil accessible HMX levels (expected bioaccessible) in RDDC2004 throughout the test period in the presence and absence of *E. andrei* (error bars: \pm SD, $n = 3$). The asterisk (*) indicates a significant difference from the control (Dunnett's test, $p < 0.05$). Within each treatment group, means sharing the

same letter are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p < 0.05$). Water-extractable HMX concentrations were below LOQ (0.14 mg kg^{-1}) in the control and the lowest treatment tested. [§] Measured total soil concentration was below the LOQ (0.29 mg kg^{-1}) so LOQ/2 was adopted as an estimate.

(b) Mean soil accessible HMX levels (expected bioaccessible) in RacFor2002 throughout the test period in the presence and absence of *E. andrei* (error bars: \pm SD, $n = 3$). The asterisk (*) indicates a significant difference from the control (Dunnett's test, $p < 0.05$). Within each treatment group, means sharing the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p < 0.05$). Water-extractable HMX concentrations were below LOQ (0.14 mg kg^{-1}) in both controls.

Fig. 2.4. Effects of Pb exposure on *E. andrei* reproduction endpoints in RDDC2004 soil (error bars: \pm SD, $n = 4$). The asterisk (*) indicates a significant difference from the control (Dunnett's test, $p < 0.05$).

Fig. 2.5. Effects of HMX exposure on *E. andrei* reproduction endpoints in RDDC2004 soil (error bars: \pm SD, $n = 4$). The asterisk (*) indicates a significant difference from the control (Dunnett's test, $p < 0.05$). [§] Measured soil concentration was below the limit of quantification (LOQ = 0.3 mg kg^{-1}) so LOQ/2 was adopted as an estimate.

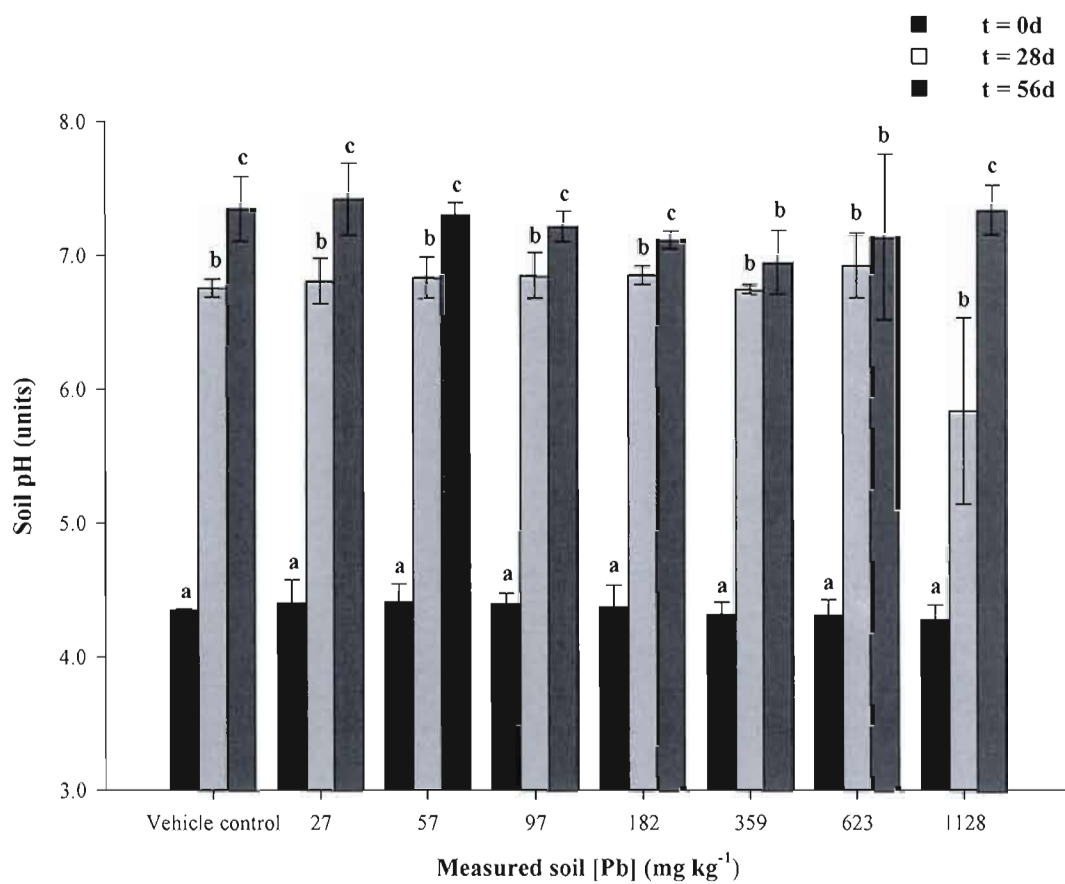


Fig. 2.1

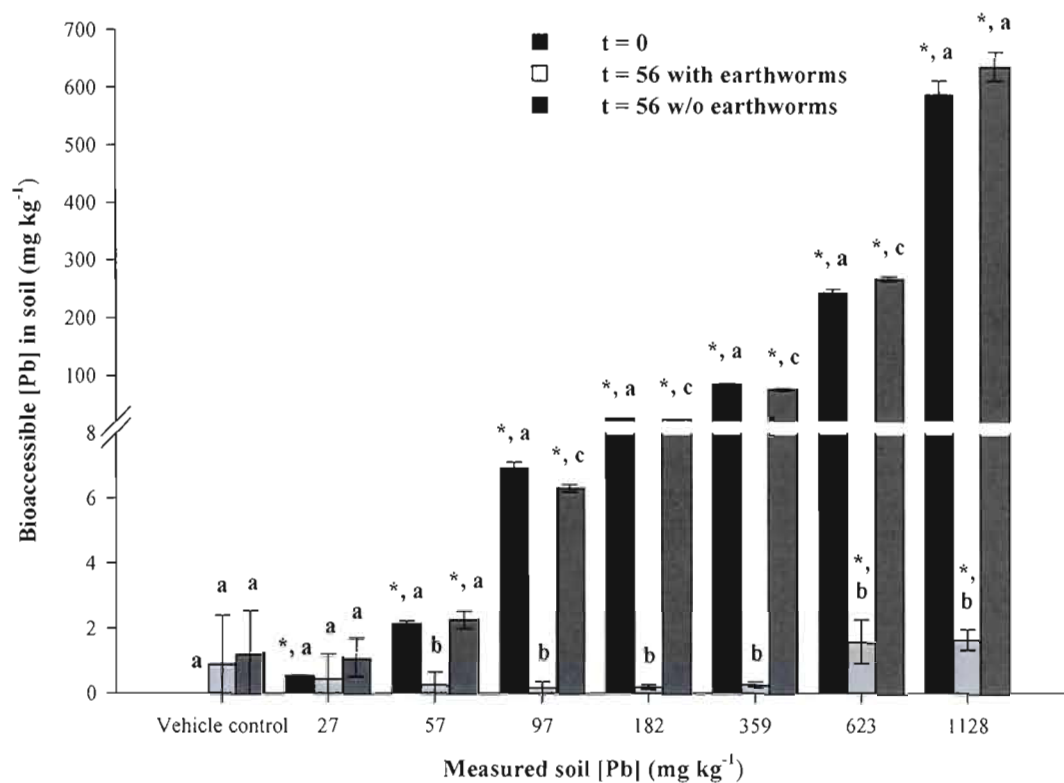


Fig. 2.2 (a)

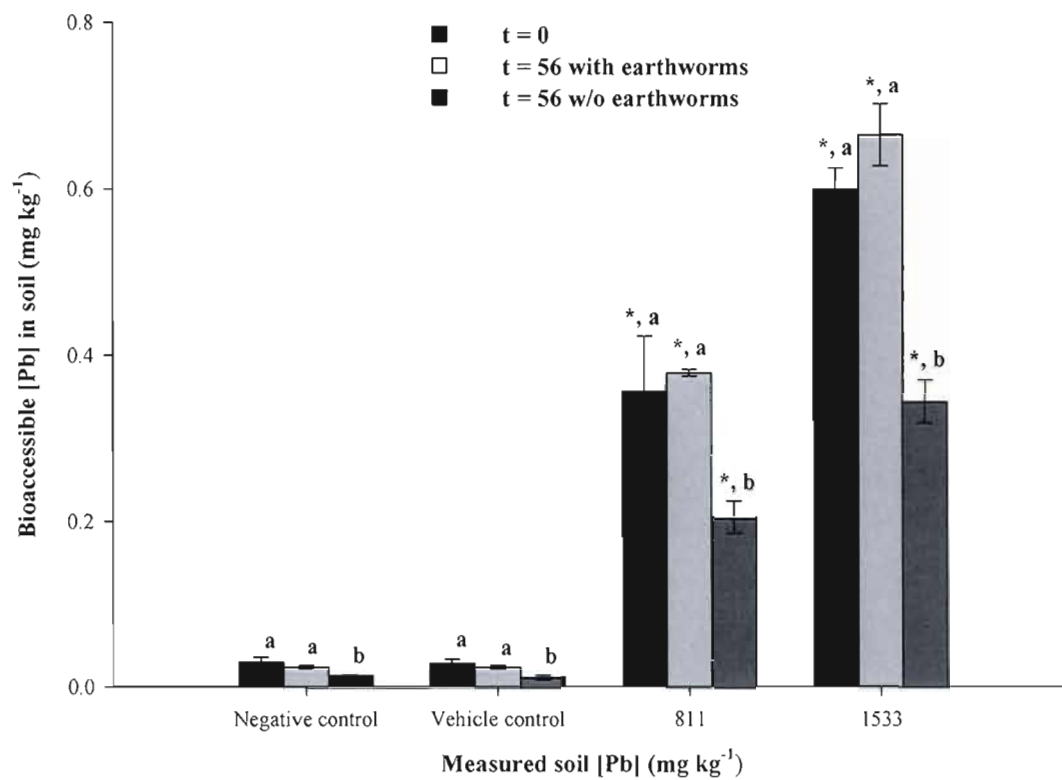


Fig. 2.2 (b)

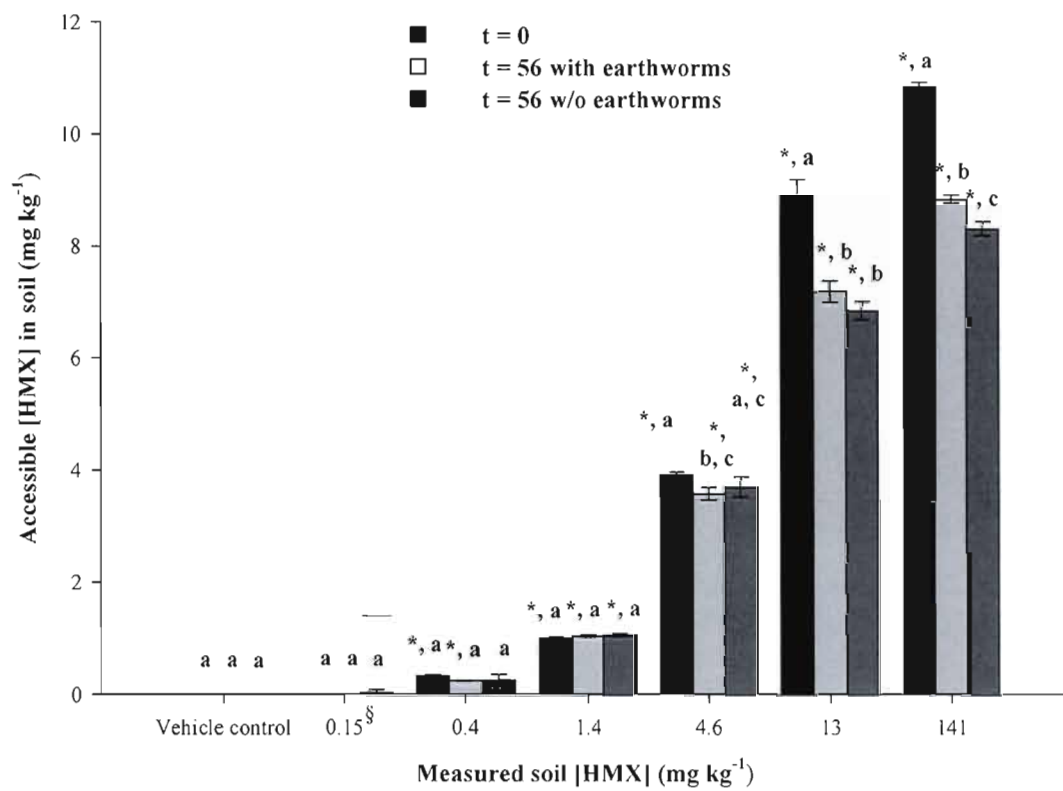


Fig. 2.3 (a)

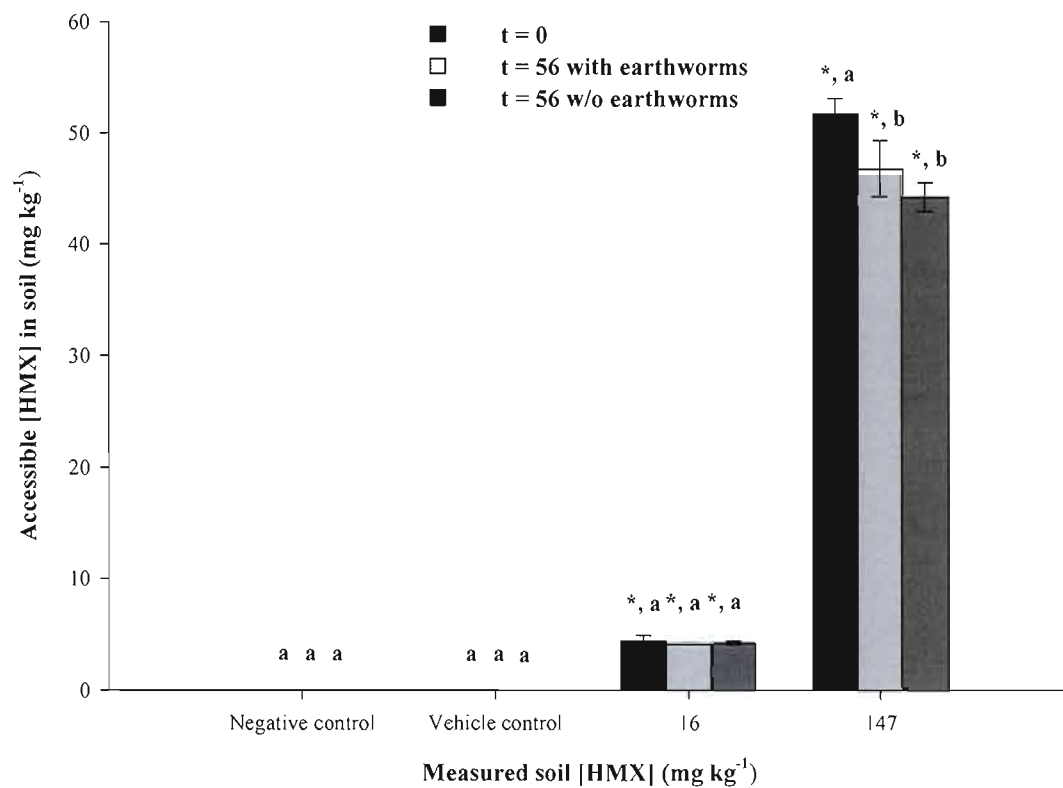


Fig. 2.3 (b)

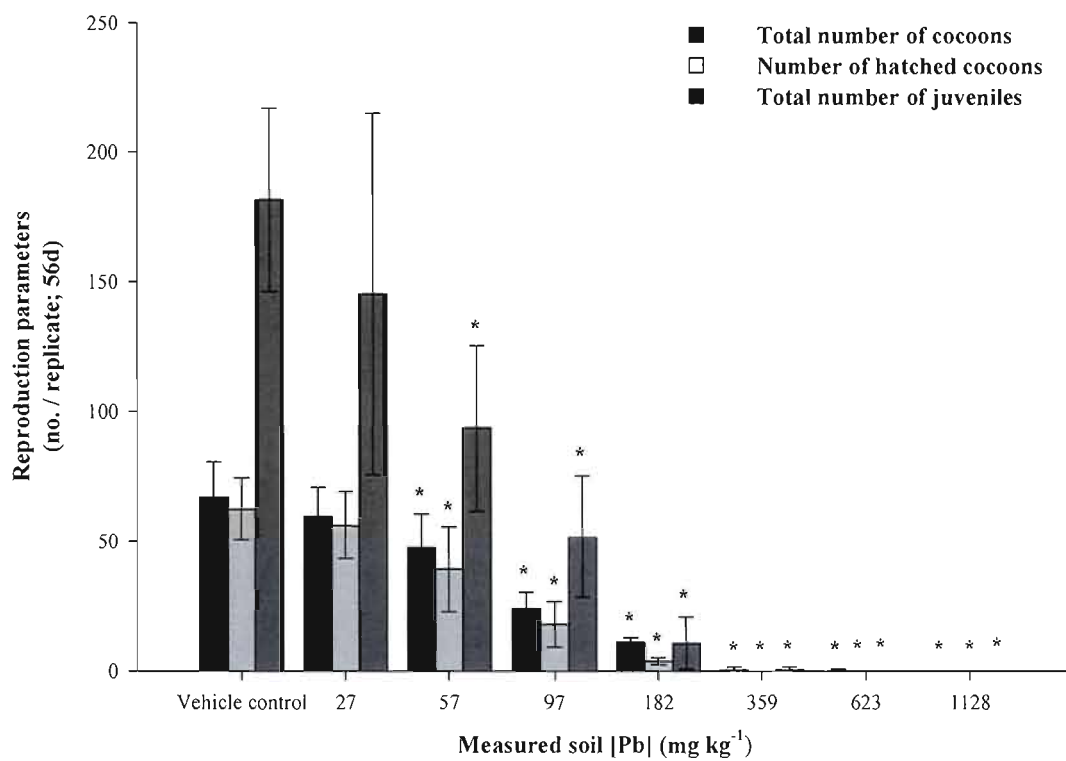


Fig. 2.4

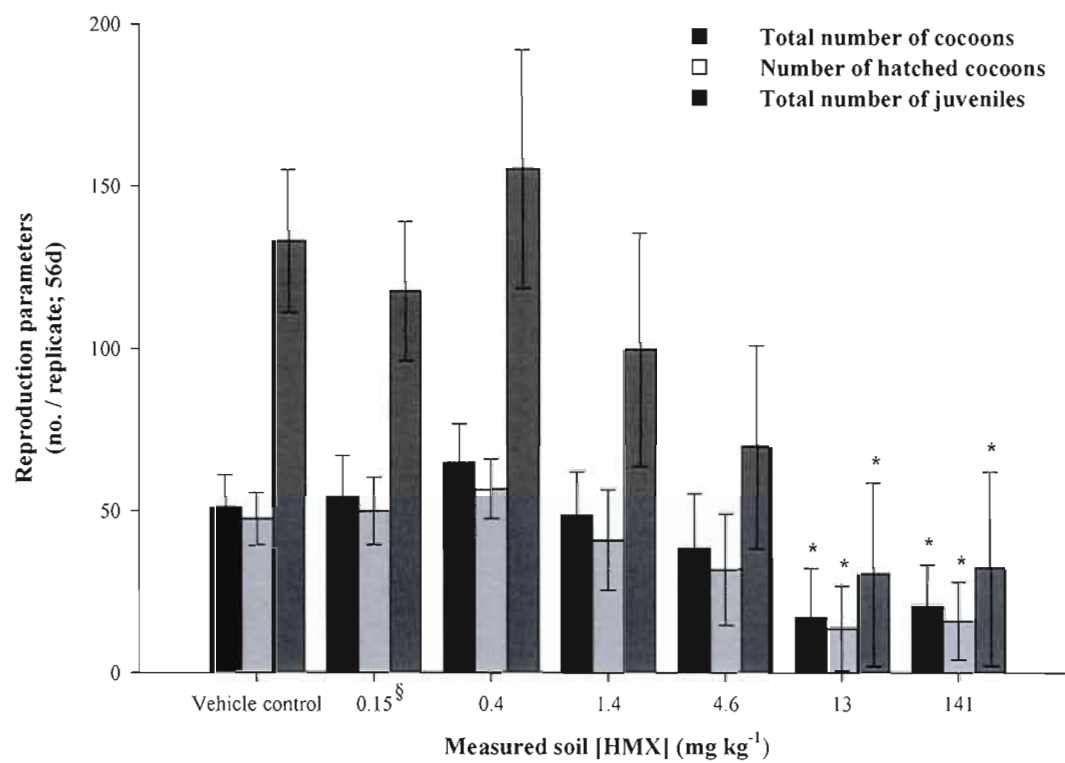


Fig. 2.5

Table 2.1. Physical characteristics of RacFor2002 and RDDC2004 soils (Al_{ox} : amorphous aluminium oxide, Fe_{ox} : amorphous iron oxide, WHC: Water Holding Capacity).

Parameter	RacFor2002	RDDC2004
Sand (%) (50-2000 μm)	89.8	98.0
Granulometry	9.1	1.7
Silt (%) (2-50 μm)	1.2	0.3
Clay (%) (<2 μm)		
Moisture (%)	36	0.3
WHC (mL/100 g soil d.w.)	123.4	23.3
Total organic carbon (%)	20	0.02
Cation exchange capacity (cmol kg ⁻¹)	48.2	8.92
pH	7.2	4.4
Fe_{ox} (%)	0.68	0.19
Al_{ox} (%)	1.09	0.32

Table 2.2. Background total metal concentrations (mg kg^{-1} dry soil) in RacFor2002 and RDDC2004 soils.

Metal	RacFor2002	RDDC2004
Ag	5.8	<2
Ba	73	9.7
Co	2.0	<2
Cr	12	3.4
Cu	67	2.3
Mn	310	60
Ni	8.9	1.9
Pb	11	<5
Zn	180	30
Al	5600	3300
B	9.0	<5
Ca	16000	830
Fe	4800	9500
Mg	2000	880
Na	410	29
Sr	77	<10
Ti	120	270
V	6.2	16

Table 2.3. Comparative summary of bioaccessibility and partitioning data for Pb and HMX in RacFor2002 and RDDC2004 soils.

Contaminant/Soil		Pb		HMX	
Bioaccessibility parameter		RDDC2004	RacFor2002	RDDC2004	RacFor2002
Bioaccessible concentration in soil (mg kg ⁻¹)	t = 0	0.01 – 587	0.03 – 0.6	0.3 – 10.8	4.4 – 51.7
	t = 56 with earthworms	0.2 – 1.7	0.02 – 0.7	0.3 – 8.8	4.2 – 46.8
	t = 56 without earthworms	1.1 – 636	0.01 – 0.3	0.3 – 8.3	4.2 – 44.3
	t = 0	0.3 – 55.9	0.04 – 0.07	64.8 – 100	29.1 – 33.3
Bioaccessible fraction in soil (%)	t = 56 with earthworms	0.06 – 1.9	0.03 – 0.05	54.0 – 94.1	27.0 – 32.6
	t = 56 without earthworms	4.4 – 52.5	0.02 – 0.03	61.6 – 96.2	25.3 – 27.0
	t = 0	1.6 – 733	16159 – 29629	0.3 – 1.1	21.9 – 26.7
K _d (L kg ⁻¹)	t = 56 with earthworms	100 – 3190	23626 – 37641	0.1 – 1.8	28.9 – 31.6
	t = 56 without earthworms	1.7 – 41.6	36944 – 44168	0.08 – 1.2	22.2 – 29.0

Table 2.4. Comparative summary of toxicity data for Pb and HMX in RacFor2002 and RDDC2004 soils.

Contaminant/Soil		Pb		HMX	
Toxicity endpoint		RDDC2004	RacFor2002	RDDC2004	RacFor2002
Lethality	NOEC	359	1533	141	147
	LOEC	623	> 1533	> 141	> 147
	LC ₅₀	579	> 1533	> 141	> 147
Adult growth	NOEC	97	1533	0.4	16
	LOEC	182	> 1533	1.4	147
	EC ₅₀	121	> 1533	2.2	> 147
Reproduction (Total number of cocoons)	NOEC	57	811	4.6	16
	LOEC	97	1533	13.4	147
	EC ₅₀	80.8	1068	9.1	31

CHAPITRE II

INTÉGRATION D'OUTILS TOXICOLOGIQUES ET CHIMIQUES POUR L'ÉVALUATION DE LA BIODISPONIBILITÉ DES MÉTAUX ET DES COMPOSÉS ÉNERGÉTIQUES DANS DES SOLS CONTAMINÉS

Ce chapitre est publié dans *Chemosphere* sous le titre suivant :

Integration of toxicological and chemical tools to assess the
bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils
Yann Berthelot, Émeline Valton, Aurélie Auroy, Bertin Trottier, Pierre
Yves Robidoux

Chemosphere (2008), doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.056

2.1 Résumé - Abstract

Résumé :

La biodisponibilité est déterminante pour la compréhension des effets qui pourraient résulter de l'exposition du biota à des sols contaminés. Les sols provenant des champs de tir et des secteurs d'entraînement militaires sont principalement contaminés par les matériaux énergétiques (ME) et les métaux. Leurs caractéristiques chimiques sont relativement bien connues et certains sols issus de Champs de Tir et de Secteurs d'Entraînement (CTSE) ont fait l'objet d'une évaluation de leur toxicité. Cependant, la biodisponibilité sur ces sites se doit d'être caractérisée de façon exhaustive. Une approche holistique de la biodisponibilité, comprenant à la fois des indicateurs chimiques et toxicologiques chez le ver de terre, a été appliquée à des sols d'un champ de tir anti-char d'une Base des Forces canadiennes. Les résultats indiquent que, bien que n'étant pas systématiquement les toxiques prépondérants, le HMX et les métaux Zn, Pb, Bi et Cd étaient les plus accessibles pour les vers de terre. Certains métaux (notamment le Cu, le Zn, le Cr et le Bi) ont également été accumulés dans les tissus des vers de terre mais ces derniers n'étaient pas nécessairement les contaminants escomptés, étant donné leur bioaccessibilité (à savoir, la disponibilité chimique des contaminants dans l'environnement pour les organismes) initiale. Les sols évalués ont inhibé la reproduction et entraîné une perte de poids chez les adultes. La mesure de paramètres sous-létaux sélectionnés a indiqué que l'intégrité lysosomiale (déterminée par le Temps de Rétention du Rouge Neutre – TRRN) était diminuée, tandis que l'activité accrue de la SOD suggère que les vers ont subi un stress oxydant. La concordance entre le profil de réponse du TRRN et celui des métaux suggère que les métaux seraient les principaux effecteurs de la déstabilisation des lysosomes dans les sols contaminés par les ME. L'approche globale adoptée vis-à-vis de l'appréciation de la biodisponibilité dans ce cas semble être une démarche prometteuse pour l'évaluation de terrains contaminés au niveau de sites spécifiques.

Mots-clés : Évaluation; Biodisponibilité; Bioaccessibilité; Explosifs; Métaux; Sols

Abstract:

Bioavailability is critical for understanding effects that might result from exposure of biota to contaminated soils. Soils from military Range and Training Areas (RTAs) are contaminated principally by energetic materials (EM) and metals. Their chemical characteristics are relatively well known and toxicity assessment of soils from RTAs are in some cases available. However, bioavailability on these sites needs to be comprehensively characterized. A holistic approach to bioavailability, incorporating both chemical and earthworm toxicological indicators, was applied to soils from an antitank firing range at a Canadian Forces Base. Results showed that HMX and the metals Zn, Pb, Bi and Cd, though not consistently the prevailing toxicants, were the most accessible to earthworms. Some metals (notably Cu, Zn, Cr and Bi) were also accumulated in earthworm tissue but those were not necessarily expected given their bioaccessibility (*i.e.*, the chemical availability of contaminants in the environment for the organisms) at the beginning of the exposure. The tested soils impaired earthworm reproduction and reduced adult growth. Measurement of selected sublethal parameters indicated that lysosomal integrity (determined as the Neutral Red Retention Time – NRRT) was decreased, while elevated superoxide dismutase (SOD) activity suggested that earthworms experienced oxidative stress. The correspondence between the NRRT and metal contamination pattern suggested that metals may be the main cause of lysosomal disruption in EM-contaminated soils.

The approach to bioavailability appraisal adopted in this case appears to be a promising practice for site-specific assessment of contaminated land.

Keywords: Assessment; Bioavailability; Bioaccessibility; Explosives; Metals; Soils

2.2 Introduction

Soil properties are known to influence toxicant behaviour and toxicity in soils (Hund-Rinke and Kördel, 2003). Indeed, it is now widely acknowledged that a high level of contamination does not necessarily mean that organisms or ecosystems will experience deleterious effects, particularly in soils (Alexander, 1995, 2000). This concept refers to the notion of bioavailability, which is now well established as a key factor in ecotoxicology and risk assessment but for which there is still no universal definition (Baveye and Bladon, 1999; Ehlers and Luthy, 2003; Peijnenburg and Jager, 2003; Semple et al., 2004). Therefore, bioavailability and related terms have been defined. Bioavailability can be defined as “the fraction of a substance that will exert an effect in a organism”. This fraction is “toxicologically bioavailable” as defined by Lanno et al. (2004). Conversely, bioaccessibility is referred to as “the fraction of a substance which is readily mobilizable by an organism in a soil”. This fraction is equivalent to the “environmentally available” fraction of Lanno et al. (2004) and is appraised chemically. The selection of measure(s) of bioavailability to be integrated into environmental monitoring and risk assessment is still debated (National Research Council, 2003). Despite the precedence usually given to the chemical approach of bioavailability, we consider that bioavailability is basically biological in nature, in agreement with a growing number of authors (Alexander et al., 2003; Lanno et al., 2004). Therefore, a chemical measure of bioavailability can be considered as such only if it is correlated with a biological endpoint. There are

different types of bioavailability measures for soil organisms which are detailed in Lanno et al. (2004). These categories of quantifications include indirect chemical measures, indirect biological measures, direct biological measures and direct chemical measures.

Bioavailability studies of contaminated soils have attempted to correlate bioaccessible contaminant levels in soil with biological responses such as biomarkers. These latter address the question of bioavailability by only responding to the bioactive fraction of pollutants in soils (Kammenga et al., 2000; Scott-Fordsmand and Weeks, 2000). However, the value of biomarkers as a surrogate measure of bioavailability requires further investigation.

Soils subjected to military operations, specifically on Range and Training Areas (RTA), are mainly contaminated with energetic compounds such as 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) as well as metals through both field use and disposal practices of armament and have already undergone ecotoxicological assessment (Simini et al., 1995; Marois et al., 2004; Thiboutot et al., 2004; Robidoux et al., 2004a, b, c; Wingfors et al., 2006). The respective toxicities of energetic materials (EM) and metals to earthworms are well characterized (Efroymson et al., 1997; Robidoux et al., 1999, 2000a, 2001, 2002b) but their bioavailabilities in soils associated with military activities are not well characterized. Theoretically, bioavailability of toxicants in military soils can be assumed to be low as metals occur

essentially as refractory shell fragments (shrapnel) and EM as patches bound to soil particles (Marois et al., 2004; Thiboutot et al., 2004). However, this postulate needs to be ascertained by collecting empirical data.

Results differed between laboratory tests and *in situ* bioassays with earthworms exposed to soils from an antitank firing range that were contaminated with energetic compounds and metals (Robidoux et al., 2004a, b, c). The differences may be explained, in part, by differences in the bioavailability of these two types of contaminants since the NRRT response did not correlate well with the exposure concentrations. Nevertheless, the use of biomarkers is being promoted for ecotoxicological assessments (Handy et al., 2003). Biomarker responses along with responses at other levels of biological organization have been applied successfully to elucidate impacts at contaminated sites (Spurgeon et al., 2005). This approach was used to identify Zn as the causative agent and provided mechanistic insight.

More extensive investigation is required to determine the actual level of bioavailable toxicants in EM-contaminated soils from military areas and to relate them to observed effects on organisms. This information is valuable from the perspective of assessment of soil quality and estimation of risk associated with explosive-contaminated sites.

The objective of this work was to achieve a bioavailability assessment of soil samples originating from a RTA by adopting an integrated approach which combines

both chemical (total, accessible and tissue contaminant concentrations) and biological (standard toxicity parameters and biomarkers) tools. In particular, this type of approach is intended to provide a more realistic and reliable view of bioavailability on those sites.

2.3 Materials and methods

2.3.1 *Chemicals and reagents*

4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1) was obtained from Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). Other chemicals were ACS reagent grade and were obtained from commercial suppliers. Balanced salt solution (BSS) for neutral red retention time determination was prepared as reported earlier (Weeks and Svendsen, 1996; Robidoux et al., 2002a). Deionized water (ASTM, type II) was obtained using a Super-Q water purification system (Millipore®) or Zenopure® Mega-90. Glassware and polyethylene containers were washed with phosphate-free detergent followed by rinses with acetone, nitric acid (10%, v/v), and deionized water.

2.3.2 *Soil characteristics and handling*

The study site was a Canadian military RTA (Wellington Anti-Tank –WAT-Range) located on the Canadian Forces Base in Gagetown (NB). The CFB Gagetown is the major training facility in eastern Canada where most of the long-range, high calibre live firing has been conducted and has been used by both Canadian and

Allied forces since 1954. The WAT Range area is approximately 5 km². The soil in the zone around the targets (tanks) is reputed to be contaminated mainly by HMX. The stations selected for assessment are located along a gradient of possibly decreasing HMX levels with distance in front of two tank wrecks devoted to target training (Fig. 3.1). These sectors constitute the major contaminated area according to recent characterization surveys (Thiboutot et al., 2004). An uncontaminated reference zone (R) in the vicinity of the polluted areas was included in this study. The soil samples (sandy type) examined in the current study were collected at different stations of the WAT site: Reference R (located outside the contaminated area, at 55 m from the firing point); Tank 2 (T2 - three samples situated at 4.6, 8.5, and 14.6 m in front of the tank) and Tank 3 (T3 - five samples located 2.7, 5.8, 11.3, 16.5, and 26.2 m ahead of the tank) (Fig. 3.1). Soil samples (ca. 20 kg fresh wt) were collected from the ground surface (0-15 cm) using a stainless-steel tool and transferred into 20-L polyethylene pails. Soil samples were transported to the laboratory, homogenized by hand and kept at 4 °C until use.

pH of the soil samples was measured using a 1:5 (v/v) suspension of soil in water (ISO, 1994). The water holding capacity was determined by saturating the soil with water and measuring the water content (Robidoux et al., 2000a). Water content was determined by loss of soil weight on drying for 18h at 105 ± 5 °C. Particle size distribution was determined using a mechanical sieve and reported according to the Wentworth scale (Wentworth, 1922). Total Organic Carbon (TOC) content was

measured with a furnace LECO SC-444-DR analyzer (LECO Corporation, St. Joseph, MI). Cation Exchange Capacity (CEC) was assessed with a Mehlich III extraction (Tran and Simard, 1996). The content of amorphous Fe and Al oxides (FEAL) was determined by ammonium oxalate-oxalic acid extraction (McKeague and Day, 1996).

Artificial soil used for negative and positive controls consisted of 70% (w/w) grade 4010 silica sand (Unimin Canada, ON), 20% colloidal kaolinite clay (CAS: 1332-56-7; EPK Clay, Edgar, FL), 10% 2-mm sieved Canadian sphagnum peat (Premier Horticulture, Red Hill, PA) according to Environment Canada (2004). Calcium carbonate (1%, w/w) was used to adjust the pH of the wetted substrate to 6.0 ± 0.5 .

2.3.3 *Earthworm rearing and preparation*

The oligochaetes *Eisenia andrei* were obtained from Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were initially used to establish the laboratory cultures. Animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst Jct, WI, USA) supplemented with dry cereal (Magic Worm Food, Magic Products), at 20 ± 1 °C, 70-80% humidity and a 16-h light/8-h dark cycle. Only sexually mature earthworms ranging in wet mass from 300 to 600 mg were used.

2.3.4 Short-term exposure

Short-term exposure was performed to assess the susceptibility and time-course of the response of some of the selected biomarkers. The setup and procedure for this test was similar to those of the reproduction test described below but with a few differences. Total duration of the exposure was 7 days. After 2 days, three worms were removed for the determination of antioxidant and detoxification activities of enzymes (detailed below). By day 7, all remaining earthworms were retrieved and split for both the measurement of antioxidant and detoxification enzymes as well as acid phosphatase activities. All specimens were handled and stored as described in the following section.

2.3.5 Chronic exposure

The sublethal toxicity of anti-tank range soils on growth and reproduction of *E. andrei* was assessed using the International Organization for Standardization Earthworm Reproduction Test (ISO, 1998). At the beginning of each experiment, 4 replicates of 250 g dry soil per concentration were rehydrated to 75% of the water-holding capacity with deionized water. Following a 24h-acclimation in clean soil, ten *E. andrei* were individually rinsed, weighed and added to each replicate glass jar containing the toxicant-amended soil. Jars were closed using lids with 1.6 mm air holes. Food (2 g of dry cereal) was added to the surface of the test matrix at the beginning of the experiment and then once weekly. The earthworms were hand sorted from the soil and the number of surviving *E. andrei* (per replicate) as well as

the individual weight (wet mass) were recorded at 28 d. The adults were then analyzed for the selected biomarkers and handled as mentioned below. The soils (containing cocoons) were then returned to their respective jars and incubated for another 28 d. At the end of the experiment (test day 56), soils were wet sieved, and the number of hatched and non-hatched cocoons as well as the number of juveniles and their wet mass were recorded. Non-hatched cocoons were differentiated by their ability to float. Data for the treatment groups were compared statistically with those for the control groups (OECD soil as negative control and sample R as reference) to determine the sublethal effects on earthworms following 28 days (adult weight change) and 56 days (reproduction) of exposure. The pH was measured before and after each treatment. Water content was also measured before and after each test.

At the end of exposures, the earthworms were split into different batches for the completion of the analyses specified below and depurated for 24 h on wet filter paper at room temperature in the dark so as to let them eliminate the gut content. The specimens were then rapidly frozen and stored at -85°C until use.

2.3.6 Biomarker measures

Determination of Neutral Red Retention Time

The effects of soil contamination on earthworms was also assessed using the neutral red retention time (NRRT) assay. This technique assesses the integrity of the lysosomal membrane by measuring the time required for leakage of the neutral red dye into the cytosol. The NRRT was determined after the exposure to the

contaminated soils using the neutral red (NR) assay as described elsewhere (Weeks and Svendsen, 1996; Robidoux et al., 2002a, 2004a, 2004b). For this assay, five surviving adult *E. andrei* from a single treatment were taken after 28 days of exposure in soil for the NRRT measurements under a light microscope (400 X). The NRRT corresponds to the time interval to get 50% of fully stained coelomocytes. The worms were then stored in a freezer at -20°C for tissue metal and EM analysis.

Biochemical Assays

Tissue preparation

For the quantification of acid phosphatase activity, thawed earthworms were first gently homogenized on ice in nine parts (w/v) of homogenisation buffer at pH 7.3, containing 250 mM sucrose, 5 mM Hepes, 1 mM EDTA (Hønsi and Stenersen, 2000). Homogenization was performed by hand, using a (15 mL) glass Potter homogenizer; unbroken cells and debris were removed by centrifugation ($900 \times g$, twice 10 min, 4°C).

To measure catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-Transferase (GST) activity, three worms were pooled and first homogenized in four parts (w/v) of homogenisation buffer (PBS, pH 7.2) with a Polytron mixer on ice for 1 minute. Homogenates were centrifuged ($14500 g$, 10 min, 4°C). The supernatant was then used for the rest of the procedure.

Protein concentrations were estimated by the dye binding method (Bradford, 1976) using serum albumin as standard. Assays were run at least in triplicate.

Acid phosphatase activity

Acid phosphatase was analyzed spectrophotometrically in microtiter plates at 405 nm by monitoring the hydrolysis of the substrate p-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) into p-nitrophenol (*p*-NP; $\epsilon = 18\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) according to the protocol of Barret (1972). Incubation was performed at 20 °C, pH 4.5 and the reaction was started by adding the substrate solution (0.2 M Na-acetate buffer at pH 4.5, 12 mM *p*-NPP, 0.6 mg mL⁻¹ BSA, and 0.1% (v/v) Triton X-100) then stopped by adding a solution containing 1 M Tris and 0.3 M potassium phosphate (pH 8.5).

Antioxidant and detoxification enzymes activities

CAT activity was assayed as described in Claiborne (1985), adapted from Saint-Denis et al. (1998) and validated by Savard (2005). The decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂), catalyzed by catalase, was monitored at 240 nm. Final assay conditions were: 50 mM NaH₂PO₄ buffer, 15 mM H₂O₂, 25 µg sample proteins, pH 7.0 and 1 mL incubation medium total volume. The incubation was conducted at 20 °C ± 2 °C and the reaction was initiated by the addition of H₂O₂.

SOD activity was assayed as described by Peskin and Winterbourn (2000) and validated by Savard (2005). Xanthine oxidase was used to produce an O₂⁻ stream, able to reduce the WST-1 salt into a formazan pigment quantifiable by

spectrophotometry at 450 nm. The assay buffer consisted of a sodium phosphate solution (50 mmol L^{-1} , pH 8.0) containing DTPA (0.1 mmol L^{-1}) and hypoxanthine (0.1 mmol L^{-1}). Homogenate aliquots were first diluted to $200 \text{ } \mu\text{g proteins mL}^{-1}$ with the homogenization buffer. For a full 96-well plate, a stock reagent mixture constituted by 19.3 mL assay buffer was mixed with 100 μL WST-1 solution (10 mmol L^{-1}), 100 μL catalase solution (2 mg mL^{-1}) and 5 μL xanthine oxidase (13.8 mg mL^{-1} ; 4.5 mU mL^{-1} final concentration) which was prepared immediately before use. A 10 μL aliquot of the diluted samples was mixed with a 190 μL aliquot of stock reagent in each well in triplicate. Final assay conditions were: 2 μg sample proteins, pH 8.0 and 200 μL incubation medium total volume. A standard series was also prepared by adding 10 μL of standard bovine SOD (final concentrations: 2, 4, 8, 16, 32 and 64 ng/well) in triplicates. The reaction was carried out at 20°C , initiated by the introduction of the reagent mixture and monitored every 2 min, for a maximum of 20 min. One unit (U) of SOD activity is defined as the amount of sample inducing 50% of inhibition of WST-1 reduction.

GST activity was determined according to the method of Habig et al. (1974) as described by Saint-Denis et al. (1998). The appearance of the GSH-CDNB conjugated complex ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was monitored at 340 nm. Standard conditions were as follows: 100 mM K_2HPO_4 buffer, 1 mM CDNB, 2 mM GSH, 30 μg sample proteins, pH 7.0 and 1 mL incubate. The reaction was conducted at $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ and initiated by the addition of GSH.

2.3.7 Bioaccessibility assessment

The chemically bioaccessible metal and soluble HMX fractions correspond to the maximal toxicant concentration extracted from the soil using a weak neutral salt aqueous solution. To assess those fractions, an extraction in 0.01 M KNO₃ aqueous solution as described by Sauvé et al. (1998) was performed. This extraction was carried out in triplicate at the beginning and the end of the reproduction test. A solid-liquid ratio of 1:10 was used, taking into account the moisture content of the soil samples. Thus, approximately 20 mL of 0.01 M KNO₃ solution was added to a weighed soil aliquot (2 g dry weight). The samples were then shaken with a rotary mixer at 50 rpm for 18 ± 2 h at room temperature and centrifuged (10 000xg, 30 min, 20 °C). Supernatant was subsequently carefully removed by pipette, the pellet was discarded and supernatant pH was recorded. The supernatant was then filtered through a 0.45 µm Millipore polytetrafluoroethylene membrane. The first 1 mL of filtrate was discarded. For metals, 10 mL of the filtrate were placed into 30 mL polyethylene vials and acidified at 2% (v/v) with trace metal quality HNO₃ for conservation at 4 °C until analysis. For HMX content analysis, an aliquot of the filtrate was mixed with acetonitrile (1:2, v/v) and stored at 4 °C for 1 h for possible precipitation. The remainder of the extract was placed into 20 mL glass vials and kept at 4 °C. Samples were then shortly centrifuged (4 000xg, 5 min, 4 °C) and transferred into HPLC vials for analysis.

2.3.8 Chemical analyses

Concentrations of EM in soil samples, adult earthworm tissue and aqueous extracts were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to the U.S. Environmental Protection Agency Method 8330A (USEPA, 1997) and as described elsewhere (Robidoux et al., 2004a, b). Energetic substances were extracted from adult earthworm tissue ($t = 28$ d) as well as from soil sampled at the beginning ($t = 0$), at mid-term ($t = 28$ d) and at the end ($t = 56$ d) of the experiments. Briefly, acetonitrile (10 mL) or water quickly followed by acetonitrile ($2 + 5$ mL) were rapidly vortexed and then added to a weighed soil (2 g – dry wt) or lyophilized earthworm tissue (0.2 – 0.5 g) sample. The mixture was vortexed for one minute. The preparation was then sonicated (60 Hz) for 18 ± 2 h at 20 °C. Next, 5 mL of supernatant from soil extracts were combined with 5 mL of CaCl_2 aqueous solution (5 g L^{-1}) in a 20-mL vial. For the tissue extracts, 3.5 mL of supernatant were combined with 1.5 mL of CaCl_2 aqueous solution (16 g L^{-1}). Finally, the extracts were filtered through a 0.45 μm Millipore polytetrafluoroethylene membrane. The first 1 mL of filtrate was discarded, and the remainder was analyzed by HPLC as documented previously (Robidoux et al., 2001, 2002b).

Metals (Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se and Zn) were extracted from soil sampled at the beginning ($t = 0$), mid-term ($t = 28$ d) and the end ($t = 56$ d) of the experiments as well as from earthworm tissue collected after 28 days of exposure. This was achieved using a conventional digestion procedure with concentrated trace-

metal grade HNO_3 (Sauvé et al., 1997). Total-recoverable metal concentrations in soil, earthworm tissue and aqueous KNO_3 extracts were measured on a inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer (ICP-AES) - Iris Advantage model [Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA].

2.3.9 *Quality control*

All experiments were done in quadruplicates or triplicates (for short-term assays), and included negative controls (artificial soil). Mortality, growth, and *E. andrei* reproduction endpoints in the reference toxicant and other established criteria (*e.g.*, response in the negative control, temperature) were verified against laboratory in-house control data to validate the toxicological analyses. The positive control results using the reference toxicant carbendazim (EC_{50} for the number of juveniles of $2.04 \pm 0.14 \text{ mg kg}^{-1}$ dry artificial soil) were consistent with in-house data and previous studies (Robidoux et al., 2004d; Savard et al., 2007). Limits of quantification (LOQ) for analytical measurements of the contaminants were determined according to the ACS method.

2.3.10 *Data analysis*

Data were expressed as the average \pm standard deviation (SD) or standard error (SE). Due to the presence, in Gagetown soils, of small HMX chunks associated with metallic shrapnel micro-fragments to which earthworms are unlikely to be exposed, chemical contamination datasets were analyzed for outliers before further statistical processing. According to the exclusion criterion adopted by Wilhelms et al. (2005)

corroborated by Grubbs' test (Grubbs, 1969), data points outside of two standard deviations were removed. When possible, parametric statistics such as Dunnett's and Tukey-Kramer's Multiple Comparison Tests were performed to detect differences from control and between means respectively. When data did not comply with parametric conditions, they were rank-transformed in an increasing order, as suggested by Conover and Iman (1981), and the aforementioned tests were run. The Jump In 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was employed.

2.4 Results

2.4.1 *Physico-chemical characteristics of soils*

Physico-chemical characteristics of the soil samples, as well as their contamination profiles, are summarized in Table 3.1 and Table 3.2, respectively. Soil pH ranged from 5.4 to 8.0 (Table 3.1) and rose significantly between the beginning and the mid-term of the test, except for the pH values of T2-15 and T2-28 which did not present significant differences between those measurement times. Thereafter, no significant difference was observed between the pH values at the mid-term and the end of the test (data not shown). Also, pH was found to decrease with distance away from both Tank 2 and 3. Total organic carbon (TOC) content in soils ranged from 1.4% to 5.7% (w/w) and increased with distance from Tanks 2 and 3. Soil texture and granulometry were primarily sandy but varied across soil samples. Soil texture also changed along the sample gradient with the fraction of sand in the soil samples

decreasing with distance from Tanks 2 and 3 with a proportional increase of the clay and silt fractions.

2.4.2 Contaminant concentrations in soils

Analytically determined concentrations of energetic compounds in the soil samples confirmed that soils were contaminated with HMX as expected (Table 3.2). Energetic compounds such as RDX and TNT (and its metabolites) were below the LOQ. Nitroglycerine (NG) was however found in some samples (T2-15, T2-28, T2-48, T3-9) but the levels were low compared to HMX ($\leq 6.2 \text{ mg kg}^{-1}$; data not shown). Data show that the HMX concentration significantly decreased with distance away from both Tank 2 and 3. The concentrations of HMX in soil did not differ significantly between the beginning and end of the 56-d exposure period for the chronic reproduction test with earthworms.

Soil metal concentrations indicate that the sampling stations located along the gradient were contaminated with various mixtures of metals, including Cu, Pb, Cr, Ni and Bi (Table 3.2). Only elements showing distinctive patterns (*i.e* Bi, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn) are reported in tables 3.2, 3.3 and 3.4. Other metals were low (Be: $\leq 1.9 \text{ mg kg}^{-1}$; Co: $\leq 15.9 \text{ mg kg}^{-1}$; Se: $\leq 21.1 \text{ mg kg}^{-1}$). Concentrations of all metals increased with increasing distance from T2 whereas they decreased for T3, except for Bi and Pb which increased again in T3-54 and T3-86. Similar to the HMX

concentrations in soil, final metal concentrations did not differ significantly from the initial concentrations.

2.4.3 *Bioaccessible levels in soils*

Bioaccessible concentrations are reported in Table 3.3. Nitroglycerin was below LOQ in all soil extracts ($< 0.5 \text{ mg kg}^{-1}$). Soluble HMX concentrations in soil exhibited the same pattern as total HMX concentrations in soil. Also, there was no difference between bioaccessible HMX levels at the beginning and the end of the 56-d assays. Cu and Ni in T2 soils were not detected in most of the soil extracts at the beginning of the test. In the case of T2 samples, bioaccessible Bi concentrations decreased with distance from the tank, as did Pb concentrations. Bioaccessible concentrations of Cd, Cr, and Zn in soil showed no distinctive pattern. For T3 samples, Cd and Zn concentrations increased with the distance from the tank so concentration gradients were established for these metals. Similar trends were observed for Bi, Cr, and Ni but the increase was less obvious. No pattern was observed for Pb along the T3 transect. Despite these patterns, no clear and consistent pattern among the sample locations for bioaccessibility of metal concentrations emerged. Additionally, significant differences were observed for some bioaccessible metal levels (*i.e.*, Cd, Cu, Pb and Zn) at the start and end of the tests.

2.4.4 *Contaminant concentrations in earthworm tissue*

No clear distance-related patterns were observed for tissue concentrations, except for Zn whose concentration increased in T2 samples and decreased in T3 samples

(Table 3.4). The most accumulated contaminants were Cu and Zn, followed by Cr, Bi, Ni and Cd whereas HMX and Pb were not detected in most cases.

2.4.5 Responses of earthworms

Only one soil sample (T2-48) was significantly lethal to earthworms (data not shown). Body weight of adults was also reduced in all soil samples compared with reference and negative control (data not presented). A distance-related trend of increasing growth impairment was noted for T2 adult worms while the reverse occurred for T3. Reproduction was affected in all contaminated soil samples compared to the reference sample (data not shown), but worms were adversely affected only in the T2-48 soil.

Compared to the reference soil, NRRT was significantly reduced in earthworms exposed to several contaminated soils (Tank 2: 28 and 48 samples; Tank 3: 9, 19, 37 and 54 samples) (Fig. 3.2), while the worms were noticeably adversely affected only in the T2-48 soil sample as mentioned above. NRRT decreased with distance in T2 soils while it increased in T3 soils.

Activities of the antioxidants, catalase and SOD increased significantly ($p < 0.05$) at 7 days and 28 days compared with 2 days of exposure (Fig. 3.3). Catalase was only affected by specific soil samples (T2-15, T2-48, T3-19 and T3-37; data not presented) whereas SOD responded to all contaminated soils after 28 days of exposure. This activation consistently increased with time of exposure for SOD but

not for catalase. This time-dependent SOD response pattern was statistically significant ($p < 0.05$). For GST activity, no particular and consistent effect pattern was observed (data not reported). Acid phosphatase activity significantly increased after 2 days of exposure in three specific samples (T3-19, T3-37 and T3-86) but this effect was transient and inconsistent and by 28 days of exposure it had decreased in T3-19 (data not shown).

2.5 Discussion

This study reports the availability, uptake and toxicity of metals and energetic compounds from military training-range soils in earthworms using standard endpoints along with a multi-marker approach and chemical extractions.

2.5.1 *Soil characteristics and contaminant concentrations in soils*

Toxicant bioaccessibility and bioavailability may have been influenced by intrinsic soil properties such as pH, organic matter or clay content in this study due to important variations in the physico-chemical parameters between Gagetown soils, as was observed in previous studies (Peijnenburg et al., 1997; Hund-Rinke and Kördel, 2003). The rise of pH observed in the presence of worms in the initially acidic soils (Table 3.1) is consistent with the findings of Ma et al. (2002) and Wen et al. (2004, 2006). Similarly, Udovic and Lestan (2007) and Udovic et al. (2007) observed a pH rise in *E. fetida* casts produced in a non-remediated Pb- and Zn-contaminated soil and in an EDTA-leached soil that had been contaminated with Cd,

Pb, and Zn, respectively. This increase of soil pH by earthworm activity may be attributable to calcium excretion into the environment by the calciferous glands (Lee, 1985) and their alkaline urine (Salmon, 2001). This statement is further attested by the Ca enrichment evidenced in earthworm casts by Udovic et al. (2007). The modulation of soil pH by earthworm activity will certainly influence in a dynamic way the mobility of contaminants, particularly metals since pH is recognized as a key factor controlling metal partitioning and hence bioaccessibility to organisms (Peijnenburg et al., 1997).

The monocyclic nitramine HMX was the main energetic compound detected in the soil samples. Nitroglycerine (NG) was also found in some soils but at much lower levels than HMX so its contribution to the effects of Gagetown soils on earthworms is assumed to be negligible in comparison with HMX and metals (Table 3.2). However, the effects of NG to earthworms is poorly documented in the scientific literature. The levels of HMX concentrations and the recorded distance-related decrease are in agreement with previous surveys of the same area (Thiboutot et al., 2004) and from similar RTAs in Canada (Marois et al., 2004; Robidoux et al., 2004a, 2004b) and Sweden (Wingfors et al., 2006). The metals of concern identified in the current assessment correspond to those described by Thiboutot et al. (2004). Cu is clearly the primary problematic metal, its concentrations exceeding by far the industrial soil quality guideline (ISQG) (Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999) of the Canadian Council of Ministers of the Environment

(CCME) and the U.S. EPA ecological soil screening value (Eco-SSL) for soil invertebrates (USEPA website) in all the tested soil samples except the reference. Recorded soil concentrations of Zn, Ni and Cr also exceeded the CCME guidelines (360 mg kg^{-1} for Zn, 50 mg kg^{-1} for Ni and 87 mg kg^{-1} for Cr) and/or the Eco-SSL values (120 mg kg^{-1} for Zn and 280 mg kg^{-1} for Ni; no value has been derived for Cr) in selected soil samples (Table 3.1). The occurrence of the rare element Bi in relatively high concentrations on the range appears as a fingerprint of shooting/military activities and contamination (Johnson et al., 2005; Fahey and Tsuji, 2006). Bi has applications as a pharmaceutical agent and is increasingly used as a substitute for Pb, due to their chemical similarity (Brown, 2000; Fahey and Tsuji, 2006). In both hunting and military ammunition, Bi is a component of the alloys used for the casing (Johnson et al., 2005; Fahey and Tsuji, 2006). The decreasing distance-related gradient in metal concentrations at tank #3 matches the HMX pattern and those of other usual metallic contamination point-sources (Spurgeon et al., 1994; Lukkari et al., 2004a). However, the discordant trend observed at tank #2 may originate from the projection of metallic shrapnel fragments from shells and tank chassis ahead of the targets due to the impact blast. The metal and HMX contamination patterns of the WAT range are consistent with that of similar RTAs (Robidoux et al., 2000b; Wingfors et al., 2006).

2.5.2 Bioaccessible levels in soils

Low-concentration neutral salt extraction was used to assess the bioaccessible (also called exchangeable pool) of contaminants since it is a relevant and frequently applied technique for metals (Houba et al., 1996; Sauvé, 2002; Menzies et al., 2007) and it is established that earthworms absorb toxicants predominantly via the soil solution/dermal route for metals in particular (Vijver et al., 2003; Scott-Fordsmand et al., 2004) but also for organic chemicals with low lipophilicity (*i.e.*, $\log K_{ow} < 5$; Belfroid et al., 1995; Jager et al., 2003). This is the case for HMX which has a $\log K_{ow}$ of 0.06 – 0.26 (Talmage et al., 1999; Monteil-Rivera et al., 2003). For example, Conder and Lanno (2000) demonstrated that toxicity of Cd, Pb and Zn to earthworms was more significantly correlated to metal concentrations in 0.1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ soil extracts than to extracts with total metals. Also, soil water extraction has been used for HMX in a study involving amended soil (Simini et al., 2003) and in a survey analogous to this one (Robidoux et al., 2004a).

Despite its low water solubility, HMX was soluble in Gagetown soils and, contrary to results reported by Robidoux et al. (2004a), water-extractable concentrations showed a distance-related pattern highly related to that of total soil HMX. In contrast to the metal situation, Monteil-Rivera et al. (2003) have determined that HMX sorption in soils is low, is mainly driven by the clay fraction and rather insensitive to soil organic content. Within the natural range encountered in the environment, pH should not affect HMX solubility as HMX is a poorly

hydrosoluble organic compound. No difference in HMX accessibility was noted between the beginning and the end of the assay despite the pH increase. These characteristics make HMX a compound that is poorly adsorbed to soils but relatively persistent in the soil surface layer due to its slow downward migration as observed by Thiboutot et al. (2004) on the same site. Accordingly, HMX appears to be fairly available to soil organisms.

Among metals, Bi, Pb and Zn followed by Cd were the most bioaccessible whereas Ni, Cr and Cu were found to be the least. Despite the heavy Cu contamination, it appears that a major part of the metal is present as poorly soluble refractory fragments from ammunition casing and is therefore not available to organisms. At the beginning of the assay, Cu was detected in the extracts of two soil samples, T3-37 and T3-86. Actually, these soils had the lowest Fe_{ox} contents, their pH values were among the most acidic and T3-37 had the lowest organic carbon level. It has been established that Cu soil partitioning is influenced by those variables (Janssen et al., 1997; Sauvé et al., 2000) so this could explain the present situation. However, Cu was significantly more bioaccessible at the end of the exposure period despite the pH rise induced by the earthworms. Similar results have been reported by Wen et al. (2004, 2006) for various soils and metals (including Cd, Cu, Cr, Ni, Pb and Zn) with a concomitant enhancement of pH and dissolved organic carbon (DOC) generated by earthworm activity. The mobilization of Cu by earthworms might be mediated by the DOC increase because Cu solubility was determined to be positively

correlated with pore-water DOC by Janssen et al. (1997). The production of heavy-metal-chelating metallophores by earthworms suggested by Wen et al. (2004) could also contribute to render Cu more soluble. This progressive and dynamic mobilization process may explain why Cu was assimilated by earthworms despite its low initial solubility.

Unlike Cu, Pb was bioaccessible in Gagetown soils at the beginning of the assay but not at the end and it was not detected in earthworm tissue (Table 3.4). As detailed below, the hypothesis of competition with Bi might account for this discrepancy (related elements). The decline in Pb bioaccessibility is likely to result from the soil pH increase observed over time. Exchangeable Pb levels were consistent with those determined in other *in situ* contamination studies (Grelle and Descamps, 1998; Van Straalen et al., 2001). Bi was found to be bioaccessible as well. But, in contrast to Pb, Bi remained soluble at the end of the exposure period and was incorporated in organisms. Aside from some investigations in uncontaminated soils (Tyler and Olsson, 2001; Hou et al., 2006), the behaviour of Bi in soils is scarcely known particularly in contaminated ones but similarities with Pb may be expected (related elements). Nevertheless, the results of a study by Johnson et al. (2005) conducted on a shooting range indicate that Bi is poorly solubilized in terrestrial substrates. The Bi salts used for the manufacture of Bi-derived products have very low aqueous solubility (Hammond, 2007) and their toxicity to terrestrial organisms is unknown. In addition, the behaviour of Bi in the environment has been

poorly studied. Therefore, the current data might point out that Bi is a toxicant to be monitored as it may cause adverse effects on biota. The more common metal Zn was recorded at high concentrations in soil extracts compared to the other metals and to exchangeable Zn from equivalent soil types (Grelle and Descamps, 1998; Van Straalen et al., 2001) but almost exclusively in soils from tank # 3. This is consistent with the lower pH and organic carbon content in T3 soils since Zn partitioning in soil is dependent on these parameters (Janssen et al., 1997; Sauvé et al., 2000; Hobbelen et al., 2006). This feature also explains why Zn became unavailable at the end of the assay. As opposed to Wen et al. (2004), no mobilization effect of earthworm bioturbation was evidenced in this case and this is probably because the pH effect on Zn solubility was predominant. On the other hand, this is congruent with the observations of Cheng and Wong (2002) who noted a decrease of exchangeable Zn concentration following the addition of earthworms (*Pheretima* sp.) to different clean soils. Extractable Cd concentrations were lower than those of the three aforementioned metals and appeared to concur with the soil pH pattern, which has been reported by others (Janssen et al., 1997; Hobbelen et al., 2006). The decrease in final bioaccessible Cd was similar to that seen with Zn and Pb. This diminution is presumably engendered by the earthworm-generated pH increase. Cr and Ni bioaccessible contents were marginal with respect to other metals as they were variable and below detection limits in several samples.

2.5.3 *Earthworm body residues*

HMX was not detected in any tissue of exposed earthworms but this is probably due to the quantity of material used for analysis (yielding a higher limit of quantification) since measurable HMX tissue concentrations were found in some mesocosm-exposed specimens of a comparable study (Robidoux et al., 2004b). Moreover, the variability in HMX uptake illustrated in the aforementioned work along with its low water solubility and K_{ow} may also account for our data (Talmage et al., 1999; Monteil-Rivera et al., 2003).

Among the metals, Pb was not accumulated by worms despite its substantial levels in the soil. Pb bioaccessibility in Gagetown soils and its variations due to the presence of organisms, notably through the pH elevation described previously, may explain this occurrence. Soil properties and subsequent metal bioaccessibility are known to modulate uptake and toxicity, notably for Pb (Nahmani et al., 2007). The most accumulated metals were Cu and Zn followed by Bi. Earthworms are recognized to concentrate Cu and Zn from contaminated soils although our results for Zn were generally lower than those of surveys from areas impacted with equivalent Zn levels (Morgan and Morgan, 1988, 1999; Kennette et al., 2002; Ma et al., 2002; Lukkari et al., 2004a). The bioaccessible Zn pattern does not corroborate the identified bioaccumulation pattern but Zn is an essential metal which is regulated in invertebrates and earthworms in particular (Morgan and Morgan, 1988). Regulation may explain the lack of correlation. Cd was not found to bioaccumulate

despite its potential to do so as shown in other studies with similar Cd concentrations (Łaszczyca et al., 2004; Hobbelen et al., 2006). These divergences can be attributed once again to the disparities of soil types and subsequent differences in Cd bioaccessibility between the studies. It may also come from interspecific differences between the test organisms and other factors accounting for variability in metal bioaccumulation (Luoma and Rainbow, 2005). Conversely, Cu body burdens were consistently higher than those documented in the literature but this can be expected as the Cu concentrations in Gagetown soils considerably exceed those of investigated regions affected by metallic pollution (Nahmani et al., 2007). Bi was also detected in earthworm tissue at fairly high concentrations compared to the other elements and, to our knowledge, this is the first report of Bi uptake in earthworms. Its bioaccumulation characteristics in ecological receptors and its ecotoxicity have not previously been investigated. Bi was absorbed by earthworms whereas Pb was not. Therefore, competitive exclusion might be responsible as these two elements belong to the same periodical family with presumably analogous properties. It is a reasonable assumption since Weltje (1998) established the occurrence of competition between common metals (*i.e.*, Cd and Pb versus Cu and Zn) in earthworm tissue. Cr and Ni body burdens were marginal compared to other metals.

The variation of metal bioaccessibility during the exposure period may contribute to the absence of a relationship between the measured bioaccessible concentration and body residue. Also, the absence of distance-related patterns among metal body

burdens compared to total soil contents, except for Zn, may arise from factors influencing bioaccessibility and uptake as cited previously.

2.5.4 Toxicity of Gagetown soils to earthworms and biomarker responses

The results obtained for global organismal toxicity endpoints indicate that the effects exerted by Gagetown soils were generally in the sublethal range, except for the T2-48 sample. This sample was the most heavily contaminated, with high concentrations of metals in particular and the occurrence of lethality in this soil concurs with existing toxicological data from laboratory and field studies (Spurgeon and Hopkin, 1995; Efroymson et al., 1997; Robidoux et al., 2004 a, b). The totally impaired reproduction observed in the current study was predictable and can also easily be explained in view of the toxicity data reported in previous studies (Spurgeon and Hopkin, 1995; Efroymson et al., 1997; Robidoux et al., 2001, 2002b, 2004 a, b; Simini et al., 2003). NG was detected in some soils but at significantly lower concentrations than HMX so its contribution to the assessed toxicity is assumed to be limited compared to the other contaminants present. However, NG toxicity to soil organisms is poorly understood.

To complement the general toxicity assessment, a multi-marker approach was applied using indicators from different physiological systems. This type of approach has been successfully applied in aquatic environments (Blaise et al., 2002; Galloway et al., 2004) and is also advocated for terrestrial habitats (Kammenga et al., 2000; Scott-Fordsmand and Weeks, 2000; Sanchez-Hernandez, 2006). Among the selected

biomarkers, NRRT and SOD were found to be the most responsive. In the case of NRRT, this could be anticipated as it is a proven non-specific but predictive biomarker of soil contamination (Svendsen et al., 2004; Sanchez-Hernandez, 2006) which responds both to metals (Svendsen et al., 2004) and energetic compounds (Robidoux et al., 2002a, 2004c). The NRRT is a relatively simple and efficient biomarker which has been demonstrated to precede higher order effects, is indicative of organismal physiological status (Moore et al., 2006) and is still a successful tool (Xiao et al., 2006; Gastaldi et al., 2007). Significant lysosomal disruption was evidenced in earthworms exposed to soils from the Canadian RTA of Wainwright, which is very similar to the Gagetown RTA (Robidoux et al., 2004a, b). NRRT in earthworms exposed to Gagetown soils exhibited a distance-related response trend that coincides with the gradients of soil metal concentrations, suggesting that metals were likely responsible for lysosomal disruption. This hypothesis is supported by data collected for metals (Svendsen et al., 1996), notably Cu (Svendsen and Weeks, 1997a, b). The early SOD signal and the consistent activity enhancement with time was somewhat unexpected. Indeed, Hønsi et al. (1999) investigated the reaction of antioxidant enzymes such as SOD and CAT in two *Eisenia* species exposed to heavy metals and concluded that these enzymes were not inducible and hence not suitable as biomarkers of metal-induced oxidative stress. Łaszczyca et al. (2004) identified a biphasic (or hormetic-like) response for SOD activity in two earthworm species exposed to soils along a contamination gradient on a metalliferous site. Yet, they

stated that no simple specific and unequivocal signal should be expected and that despite the complexity of their response, antioxidant activities are promising earthworm biomarkers of exposure in earthworms. Furthermore, Luo et al. (1999) found that SOD was activated in *Eisenia fetida* after exposure to two insecticides. In our case, SOD responded well to contamination and this may reflect that the earthworms experienced oxidative stress when exposed to Gagetown soils. As heavy metals failed to induce SOD in the work of Hønsi et al. (1999), we speculate that HMX or one of its metabolites, for which the toxicity mechanisms remain unknown, may account for the activity increase seen here. However, this hypothesis requires verification but is conceivable based on known biodegradation pathways for HMX (Hawari et al., 2000; Crocker et al., 2006).

An early CAT signal was detected in some soils after 2 days of exposure but not afterwards while SOD was activated. This transience may arise from the interaction between the different agents of the antioxidant metabolism such as the compensatory process (or hormetic-like response) between CAT and glutathione peroxidases reported by Łaszczyca et al. (2004). Another hypothesis may be that H_2O_2 produced by SOD catalysis overrides the processing capacity of organismal H_2O_2 metabolic pathways (which include CAT) and is therefore available to exert deleterious effects such as peroxidation of biomolecules, especially membrane lipids. This would link the oxidative stress to lysosomal disruption in earthworms, in a similar way to what has been done for aquatic organisms (Regoli et al., 1998; Regoli, 2000; Frenzilli et

al., 2004). Otherwise, the restrained responsiveness of CAT in this study concurs with previous results (Saint-Denis et al., 1999, 2001; Ribera et al., 2001).

Finally, the two other assessed markers (GST and AP) were globally unaffected by soil contamination. For GST, this is consistent with the majority of previous observations (Stokke and Stenersen, 1993; Borgeraas et al., 1996; Grelle and Descamps, 1998; Saint-Denis et al., 1999, 2001; Ribera et al., 2001). Increasing GST activity with soil metal contamination or a biphasic signal was documented in two other field surveys (Łaszczyca et al., 2004; Lukkari et al., 2004b). It should however be stressed that in the present study, the test species was *Eisenia* and not *Aporrectodea* sp. Moreover, the compensatory mechanism between antioxidant functions such as CAT, SOD, GPx, GR and GST observed by Łaszczyca et al. (2004) may account for the absence of response in GST. AP activity has been proposed as a new potential biomarker by Hønsi et al. (2000) and, to our knowledge, this is the first attempt to use it as a biomarker. The lack of effect could be due to the fact that the method used in our study did not separate the cytosolic AP from the lysosomal one as performed by Hønsi et al. (2000).

2.6 Conclusion

This study indicates that occurrence of both HMX and several metals accounts for the various effects observed on earthworms, in agreement with previous findings concerning an antitank firing range. Metals were significant contributors to the

detected toxicity as HMX is non-lethal and they appeared largely responsible for the lysosomal disruption noted in earthworms. On the other hand, the hypothesis that HMX might be an important factor in causing other effects such as oxidative stress cannot be ruled out. The integrated approach applied here seems useful and relevant to provide a synthetic and more relevant picture of bioavailability and toxicity in EM-contaminated soils, due to the multiplicity of factors and processes involved and pattern complexity. This procedure brings forward interesting perspectives for ecological risk assessment of EM-contaminated sites. The outcome of this study shows that a univocal analysis (*e.g.* exclusively chemical or biological) would be at least fragmentary and perhaps even misleading.

Since this is the first multifactorial assessment of soils impacted by military activities and due to the complexity of processes involved, our approach needs to be further refined and improved to fill the gaps and enhance the understanding of the processes at play. This is notably the case for the mode of action and soil partitioning of EM or the interaction between toxicants in terms of toxicity and bioaccumulation. Such knowledge will help to establish the causality of the observed effects and render the approach more robust. As an example, the work carried out by Savard et al. (2007) is a significant step in that direction.

2.7 Acknowledgements

We thank Drs. Sébastien Sauvé and Carmen Donisa from the Department of Analytical Chemistry at Université de Montréal for analytical support with metals. Gratitude is also expressed to Louise Paquet and Dr. Fanny Monteil-Rivera from the Environmental Chemistry Group as well as Kathleen Savard and Manon Sarrazin from the Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute – National Research Council of Canada for technical assistance and scientific advice concerning energetic compounds. We are also grateful to Université du Québec à Montréal for the doctoral fellowships awarded to Yann Berthelot and to Drs. Sonia Thiboutot and Guy Ampleman from Defence Research and Development Canada – Valcartier (Canadian Ministry of National Defence) for their support of this project.

2.8 References

- Alexander, M., 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 29, 2713–2717.
- Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259–4265.
- Alexander, M., Cunningham, S.D., Chaney, R.R., Hughes, J.B., Harmsen, J., 2003. Chemical measures of bioavailability. In: Lanno, R.P. (Ed.). *Contaminated Soils: From Soil-Chemical Interactions to Ecosystem Management*. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp. 345-362.
- Barret, A.J., 1972. Lysosomal enzymes. In: Dingle, J.T. (Ed.). *Lysosome. A Laboratory Handbook*. North Holland, Amsterdam, The Netherlands, pp. 46-135.
- Baveye, P., Bladon, R., 1999. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment: A critical perspective. In: Baveye, P., Block, J.C., Goncharuk, V.V. (Eds.). *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment: Practical Consequences for the Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 227-248.
- Belfroid, A., Seinen, W., van Gestel, K., Hermens, J., van Leeuwen, K., 1995. Modelling the accumulation of hydrophobic organic chemicals in earthworms: Application of the equilibrium partitioning theory. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2, 5-15.

- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., Trottier, S., 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Environ. Toxicol. 17, 170-186.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brown, R.D., 2000. Bismuth. In: United States Geological Survey (Ed.). USGS Minerals Yearbook, Vol. I, Metals and Minerals. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., pp. 13.1-13.4.
- Borgeraas, J., Nilsen, K., Stenersen, J., 1996. Methods for purification of glutathione transferases in the earthworm genus *Eisenia* and their characterisation. Comp. Biochem. Phys. C. 114, 129-143.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 1999. Canadian environmental quality guidelines, Update 6.0 (July 2006). Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, MB, Canada.
- Cheng, J., Wong, M.H., 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. Biol. Fert. Soils. 36, 72-78.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.). Handbook of Methods for Oxygen Research. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 283-284.

- Conder, J.M., Lanno, R.P., 2000. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 41, 1659-1668.
- Conover, W.J., Iman, R.L., 1981. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *Am. Stat.* 35, 124-129.
- Crocker, F.H., Indest, K.J., Fredrickson, H.L., 2006. Biodegradation of the cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20. *Appl. Microbiol. Biot.* 73:274–290.
- Efroymsen, R.A., Will, M.E., Suter II, G.W., 1997. Toxicological benchmarks for contaminants of potential concern for effects on soil and litter invertebrates and heterotrophic process: 1997 revision. Oak Ridge National Laboratory Report ES/ER/TM-126/R2, 151 p.
- Ehlers, L.J., Luthy, R.G., 2003. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 37, 295A–302A.
- Environment Canada, 2004. Biological test method: tests for toxicity of contaminated soils to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). EPS 1/RM/43. Method Development and Applications Section, Environmental Technology Centre, Ottawa, ON.
- Fahey, N.S.C., Tsuji, L.J.S., 2006. Is there a need to re-examine the approval of bismuth shotshell as a non-toxic alternative to lead based on the precautionary principle? *J. Environ. Monitor.* 8, 1190-1194.

- Frenzilli, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, M., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Mar. Environ. Res.* 58, 609-613.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1723-1731.
- Gastaldi, L., Ranzato, E., Capri, F., Hankard, P., Pérès, G., Canesi, L., Viarengo, A., Pons, G., 2007. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 146, 398-405.
- Grelle, C., Descamps, M., 1998. Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on glutathione-S-transferase activity. *Pedobiologia* 42, 289-297.
- Grubbs, F.E., 1969. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* 11, 1-21.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hammond, C.R., 2007. The elements. In: Lide, D.R. (Ed.). *Handbook of Chemistry and Physics*, 87th edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 4.1-4.42.

- Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331-343.
- Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S., Ampleman, G., 2000. Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Appl. Microbiol. Biot.* 54, 605-618.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C.A.M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environ. Pollut.* 144, 639-646.
- Hønsi, T.G., Hoel, L., Stenersen, J.V., 1999. Non-inducibility of antioxidant enzymes in the earthworms *Eisenia veneta* and *E. fetida* after exposure to heavy metals and paraquat. *Pedobiologia* 43, 652-657.
- Hønsi, T.G., Stenersen, J., 2000. Activity and localisation of the lysosomal marker enzymes acid phosphatase, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, and β -galactosidase in the earthworms *Eisenia fetida* and *E. veneta*. *Comp. Biochem. Phys. B.* 125, 429-437.
- Hou, H., Takamatsu, T., Koshikawa, K., Hosomi, M., 2006. Concentrations of Ag, In, Sn, Sb and Bi, and their chemical fractionation in typical soils in Japan. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 214-227.

- Houba, V.J.G., Lexmond, Th.M., Novozamsky, I., van der Lee, J.J., 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci. Tot. Environ.* 178, 21-28.
- Hund-Rinke, K., Kördel, W., 2003. Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: Experimental methods. *Ecotox. Environ. Safe.* 56, 52-62.
- International Organization for Standardization (ISO), 1994. Soil quality- Determination of pH. ISO 103390, International Standard. ISO, Geneva.
- International Organization for Standardization (ISO), 1998. Soil quality: effects of soil pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: determination of effects on reproduction. ISO 11268-2, International Standard. ISO, Geneva.
- Jager, T., Fleuren, R.H.L.J., Hogendoorn, E.A., De Korte, G., 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37, 3399-3404.
- Janssen, R.P.T., Posthuma, L., Baerselman, R., Den Hollander, H.A., van Veen, R.P.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 1997. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. I. Relationships between metal partition coefficients and soil characteristics. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2470-2478.
- Johnson, C.A., Moench, H., Wersin, P., Kugler, P., Wenger, C., 2005. Solubility of antimony and other elements in samples taken from shooting ranges. *J. Environ. Qual.* 34, 248-254.

- Kammenga, J.E., Dallinger, R., Donker, M.H., Köhler, H.R., Simonsen, V.,
 Triebskorn, R., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for
 ecotoxicological soil risk assessment. *Rev. Environ. Contam. T.* 164, 93-147.
- Kennette, D., Hendershot, W., Tomlin, A., Sauvé, S., 2002. Uptake of trace metals
 by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in urban contaminated soils. *Appl.*
Soil Ecol. 19, 191-198.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of
 chemicals in soil for earthworms. *Ecotox. Environ. Safe.* 57, 39-47.
- Łaszczyca, P., Augustyniak, M., Babczynska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula,
 P.L., Wilczek, G., Witas, I., 2004. Profiles of enzymatic activity in
 earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz
 (Poland). *Environ. Int.* 30, 901-910.
- Lee, K.E., 1985. *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land*
Use. Academic Press, Sydney, Australia.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A., Haimi, J., 2004a. Effects of heavy
 metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils.
Ecotox. Environ. Safe. 59, 340-348.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J., 2004b.
 Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper
 and zinc exposure: differences between populations with and without earlier
 metal exposure. *Environ. Pollut.* 129, 377-386.

- Luo, Y., Zang, Y., Zhong, Y., Kong, Z., 1999. Toxicological study of two novel pesticides on *Eisenia foetida*. Chemosphere 39, 2347-2356.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environ. Sci. Technol. 39, 1921-1931.
- Ma, Y., Dickinson, N.M., Wong, M.H., 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. Biol. Fert. Soils. 36, 79-86.
- Marois, A., Gagnon, A., Thiboutot, S., Ampleman, G., Bouchard, M., 2004. Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînement, Base des Forces canadiennes, Valcartier. Defence Research and Development Canada Valcartier, Department of National Defence Canada. TR 2004-206, 78 p.
- McKeague, J.A., Day, J.H., 1996. Ammonium oxalate extraction of amorphous iron and aluminium. In: Carter, M.R. (Ed.). Soil Sampling and Methods of Analysis. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 214-243.
- Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. Environ. Pollut. 145, 121-130.
- Monteil-Rivera, F., Groom, C., Hawari, J., 2003. Sorption and degradation of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in soil. Environ. Sci. Technol. 37, 3878-3884.

- Moore, M.N., Icarus, A.J., McVeigh, A., 2006. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Environ. Res.* 61, 278–304.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1988. Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environ. Pollut.* 54, 123-138.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1999. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): Implications for ecotoxicological testing. *Appl. Soil Ecol.* 13, 9-20.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environ. Pollut.* 145, 402-424.
- National Research Council (NRC), 2003. Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools and Applications. National Academies Press, Washington, D.C., USA.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotox. Environ. Safe.* 56, 63-77.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P., Allen, H.E., 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotox. Environ. Safe.* 37, 163-172.

- Peskin, A.V., Winterbourn, C.C., 2000. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water soluble tetrazolium salt (WST-1). Clin. Chim. Acta. 293, 157-166.
- Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: A predictive biomarker of oxidative stress. Aquat. Toxicol. 50, 351-361.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998. Lysosomal and antioxydant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. Aquat. Toxicol. 40, 375-392.
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Saint-Denis, M., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. Soil Biol. Biochem. 33, 1123-1130.
- Robidoux, P.Y., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Sunahara, G.I., 1999. Acute toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) using the earthworm (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safe. 44, 311-321.
- Robidoux, P.Y., Svendsen, C., Caumartin, J., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Weeks, J.M., Sunahara, G.I., 2000a. Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. Environ Toxicol Chem. 19, 1764-1773.
- Robidoux, P.Y., Bardai, G., Sarrazin, M., Paquet, L., Gong, P., Hawari, J., Sunahara G.I., 2000b. Ecotoxicological risk assessment of an antitank firing range

- contaminated with explosives. Biotechnology Research Institute, Montreal, Quebec, Canada. NRCC # 43317, 54 p.
- Robidoux, P.Y., Hawari, J., Thiboutot, S., Sunahara, G.I., 2001. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. Environ. Pollut. 111, 283-292.
- Robidoux, P.Y., Svendsen, C., Sarrazin, M., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Weeks, J.M., Sunahara, G.I., 2002a. Evaluation of tissue and cellular biomarkers to assess 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) exposure in earthworms: effects-based assessment in laboratory studies using *Eisenia andrei*. Biomarkers 7, 306-321.
- Robidoux, P.Y., Hawari, J., Bardai, G., Paquet, L., Ampleman, G., Thiboutot, S., Sunahara, G.I., 2002b. TNT, RDX and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil. Arch. Environ. Con. Tox. 43, 379-388.
- Robidoux, P.Y., Gong, P., Sarrazin, M., Bardai, G., Paquet, L., Hawari, J., Dubois, C., Sunahara, G.I., 2004a. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. Ecotox. Environ. Safe. 58, 300-313.
- Robidoux, P.Y., Dubois, C., Hawari, J., Sunahara, G.I., 2004b. Assessment of soil toxicity from an antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei* in mesocosms and laboratory studies. Ecotoxicology 13, 603-614.

- Robidoux, P.Y., Svendsen, C., Sarrazin, M., Thiboutot, S., Ampleman, G., Hawari, J., Weeks, J.M., Sunahara, G.I., 2004c. Assessment of a 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated site using *Aporrectodea rosea* and *Eisenia andrei* in mesocosms. Arch. Environ. Con. Tox. 48, 56-67.
- Robidoux, P.Y., Sunahara, G.I., Savard, K., Berthelot, Y., Dodard, S., Martel, M., Gong, P., Hawari, J., 2004d. Acute and chronic toxicity of the new explosive CL-20 to the earthworm (*Eisenia andrei*) exposed to amended natural soils. Environ Toxicol Chem. 23, 1026-1034.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F., Ribera, D., 1998. Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in earthworm *Eisenia fetida andrei*. Arch. Environ. Con. Tox. 35, 602-614.
- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Ribera, D., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. Soil Biol. Biochem. 33, 395-404.
- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Thybaud, E., Ribera, D., 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. Soil Biol. Biochem. 31, 1837-1846.
- Salmon, S., 2001. Earthworm excreta (mucus and urine) affect the distribution of springtails in forest soils. Biol. Fert. Soils. 34, 304-310.

- Sanchez-Hernandez, J.C., 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev. Environ. Contam. T.* 188, 85-126.
- Sauvé, S., McBride, M., Hendershot, W., 1997. Speciation of lead in contaminated soils. *Environ. Pollut.* 98, 149-155.
- Sauvé, S., McBride, M., Hendershot, W., 1998. Soil solution speciation of lead (II): effect of organic matter and pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 618-621.
- Sauvé, S., Hendershot, W.A., Allen, H.E., 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden and organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1125-1131.
- Sauvé, S., 2002. Speciation of metals in soils. In: Allen, H.E. (Ed.). *Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants*. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp. 7-37.
- Savard, K., 2005. Evaluation des effets d'une exposition simultanée à des composés polynitro-organiques et certains métaux chez le ver de terre. Master thesis, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, 129 p.
- Savard, K., Berthelot, Y., Auroy, A., Spear, P., Trottier, B., Robidoux, P.Y., 2007. Effects of HMX-lead mixtures on reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. *Arch. Environ. Con. Tox.* 53, 351-358.
- Scott-Fordsmand, J.J., Stevens, D., McLaughlin, M., 2004. Do earthworms mobilize fixed zinc from ingested soil? *Environ. Sci. Technol.* 38, 3036-3039.

- Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in earthworms. *Rev. Environ. Contam. T.* 165, 117-159.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* 38, 228A-231A.
- Simini, M., Checkai, R.T., Kuperman, R.G., Phillips, C.T., Kolakowski, J.E., Kurnas, C.W., Sunahara, G.I., 2003. Reproduction and survival of *Eisenia fetida* in a sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia* 47, 657-662.
- Simini, M., Wentzel, R.S., Checkai, R., Phillips, C., Chester, N.A., Major, M.A., Amos, J.C., 1995. Evaluation of soil toxicity at Joliet Army Ammunition Plant. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 623-630.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1995. Extrapolation of the laboratory based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology* 4, 190-205.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., Jones, D.T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 84, 123-130.

- Spurgeon, D.J., Ricketts, H., Svendsen, C., Morgan, A.J., Kille, P., 2005. Hierarchical responses of soil invertebrates (earthworms) to toxic metal stress. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5327-5334.
- Stokke, K., Stenersen, J., 1993. Non-inducibility of the glutathione transferases of the earthworm *Eisenia andrei*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 106, 753-756.
- Svendsen, C., Meharg, A.A., Freestone, P., Weeks, J.M., 1996. Use of an earthworm lysosomal biomarker for the ecological assessment of pollution from an industrial plastics fire. *Appl. Soil Ecol.* 3, 99-107.
- Svendsen, C., Weeks, J.M., 1997a. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I. Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. *Ecotox. Environ. Safe.* 36, 72-79.
- Svendsen, C., Weeks, J.M., 1997b. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. II. Validation and applicability under field conditions in a mesocosm experiment with *Lumbricus rubellus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 36, 80-88.
- Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Hankard, P.K., Weeks, J.M., 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: Is it a workable earthworm biomarker? *Ecotox. Environ. Safe.* 57, 20-29.
- Talmage, S.S., Opresko, D.M., Maxwell, C.J., Welsh, C.J.E., Cretella, F.M., Reno, P.H., Daniel, F.B., 1999. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Rev. Environ. Contam. T.* 161, 1-156.

- Thiboutot, S., Ampleman, G., Marois, A., Gagnon, A., Bouchard, M., Hewitt, A., Jenkins, T.F., Walsh, M.E., Bjella, K., Ramsey, C., Ranney T.A., 2004. Environmental conditions of surface soils, CFB Gagetown training area: delineation of the presence of munitions related residues (phase III, final report). Defence Research and Development Canada Valcartier, Department of National Defence Canada. TR 2004-205, 59 p.
- Tran, T.S., Simard, R.R., 1996. Mehlich III-extractable elements. In: Carter, M.R. (Ed.). Soil Sampling and Methods of Analysis. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 43-49.
- Tyler, G., Olsson, T., 2001. Concentrations of 60 elements in the soil solution as related to the soil acidity. *Eur. J. Soil Sci.* 52, 151-165.
- Udovic, M., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after remediation. *Environ. Pollut.* 148, 663-668.
- Udovic, M., Plavc, Z., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere* 70, 126-134.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1997. Method 8330A: Nitroaromatics and nitramines by high performance liquid chromatography (HPLC). In Test Methods for Evaluating Solid Waste. SW-846. Update III,

Part 4:1 (B). Office of Solid Waste, Washington, DC. Available from:

<<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8330a.pdf>>.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) website. Eco-SSL criteria.

Available from: <<http://www.epa.gov/ecotox/ecossl/>>.

Van Straalen, N.M., Butovsky, R.O., Pokarzhevskii, A.D., Zaitsev, A.S., Verhoef,

S.C., 2001. Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia). *Pedobiologia* 45, 451-466.

Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., van Gestel, C.A.M., 2003. Oral

sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 35, 125-132.

Weeks, J.M., Svendsen, C., 1996. Neutral red retention by lysosomes from

earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1801-1805.

Weltje, L., 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in

earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere* 36, 2643-2660.

Wen, B., Hu, X., Liu, Y., Wang, W., 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*)

in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biol. Fert. Soils.* 40, 181-187.

- Wen, B., Liu, Y., Hu, X., Shan, X., 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere* 63, 1179-1186.
- Wentworth, C.K., 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *J. Geol.* 30, 377-392.
- Wilhelms, K.W., Cutler, S.A., Proudman, J.A., Anderson, L.L., Scanes, C.G., 2005. Atrazine and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sexually maturing precocial birds: Studies in male japanese quail. *Toxicol. Sci.* 86, 152-160.
- Wingfors, H., Edlund, C., Hägglund, L., Waleij, A., Sjöström, J., Karlsson, R.M., Leffler, P., Qvarfort, U., Ahlberg, M., Thiboutot, S., Ampleman, G., Martel, R., Duvalois, W., Creemers, A., van Ham, N., 2006. Evaluation of the contamination by explosives and metals in soils at the Älvdalen shooting range. Part II: Results and Discussion. FOI-Swedish Defence Research Agency, NBC Defence, Umeå, Sweden. Report FOI-R-1877-SE, 47 p.
- Xiao, N.W., Song, Y., Ge, F., Liu, X.H., Ou-Yang, Z.Y., 2006. Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere* 65, 907–912.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 3.1. Sampling plan, Wellington Anti-Tank (WAT) Range, Canadian Forces Base of Gagetown (NB). Distances of the sampling spots from the tank are reported in “feet” as the second digit after the tank label.

Fig. 3.2. Mean lysosomal neutral red retention time (NRRT) determined for earthworms exposed to Gagetown soil samples under laboratory conditions (error bars: \pm SE, $n=4$ of 3-4 worms). * Significantly different from reference soil R (Dunnett’s test, $p < 0.05$).

Fig. 3.3. Mean SOD activity measured for earthworms exposed to Gagetown soil samples under laboratory conditions (error bars: \pm SE, $n=4$). One unit (U) of SOD activity corresponds to the amount of SOD in the sample required to generate 50% of inhibition of WST-1 reduction. * Significantly different from reference soil R (Dunnett’s test, $p < 0.05$). Within each treatment group, means sharing the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer’s test, $p < 0.05$).

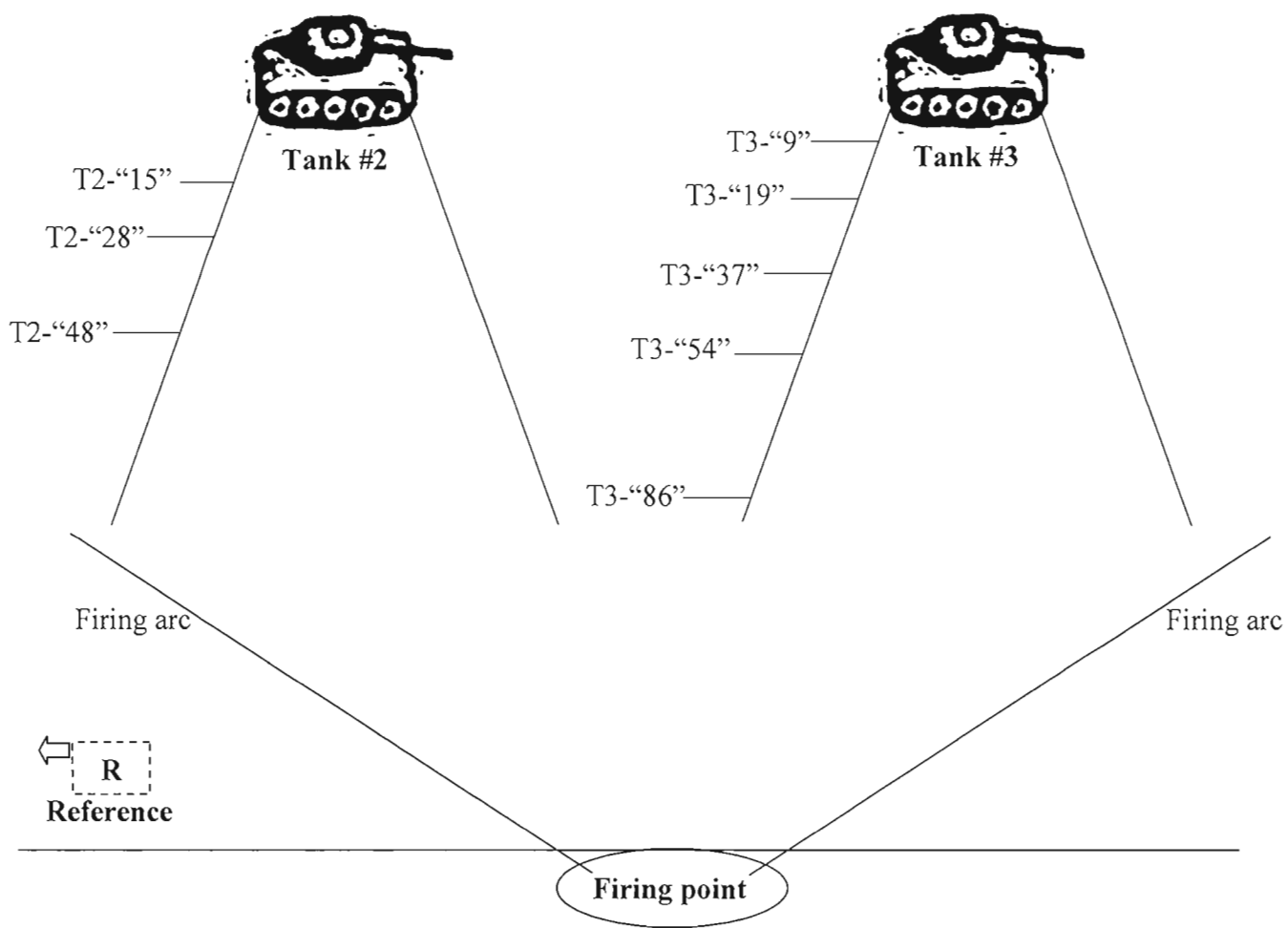
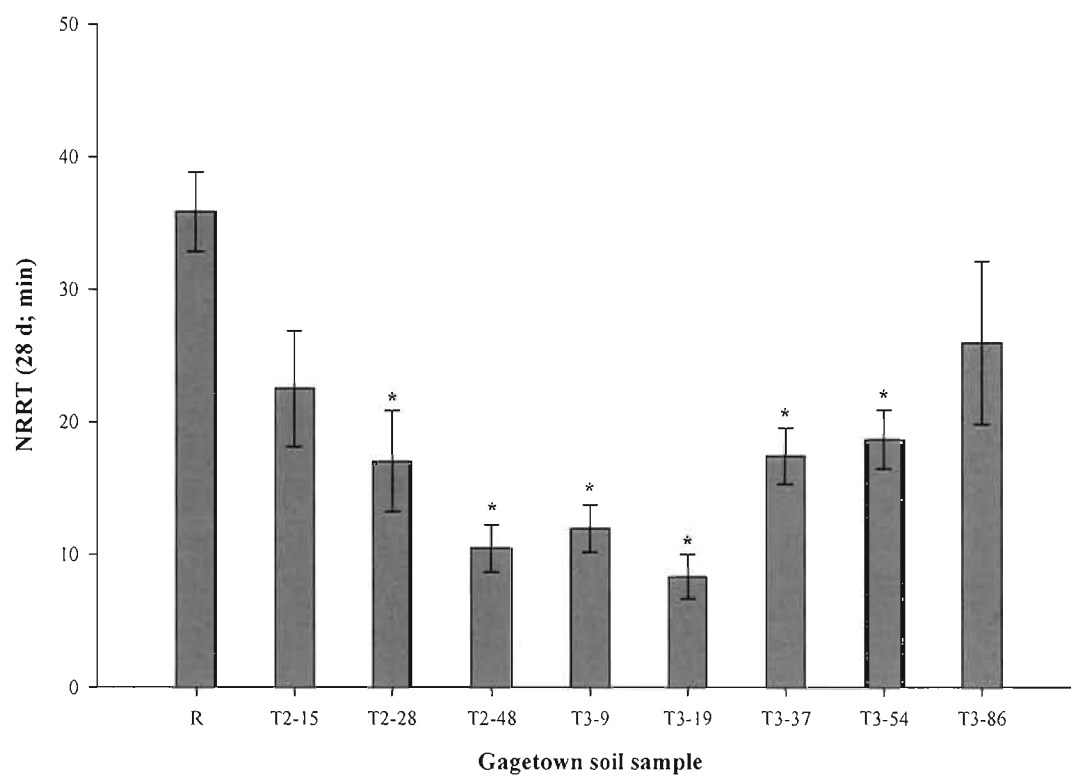


Fig. 3.1

**Fig. 3.2**

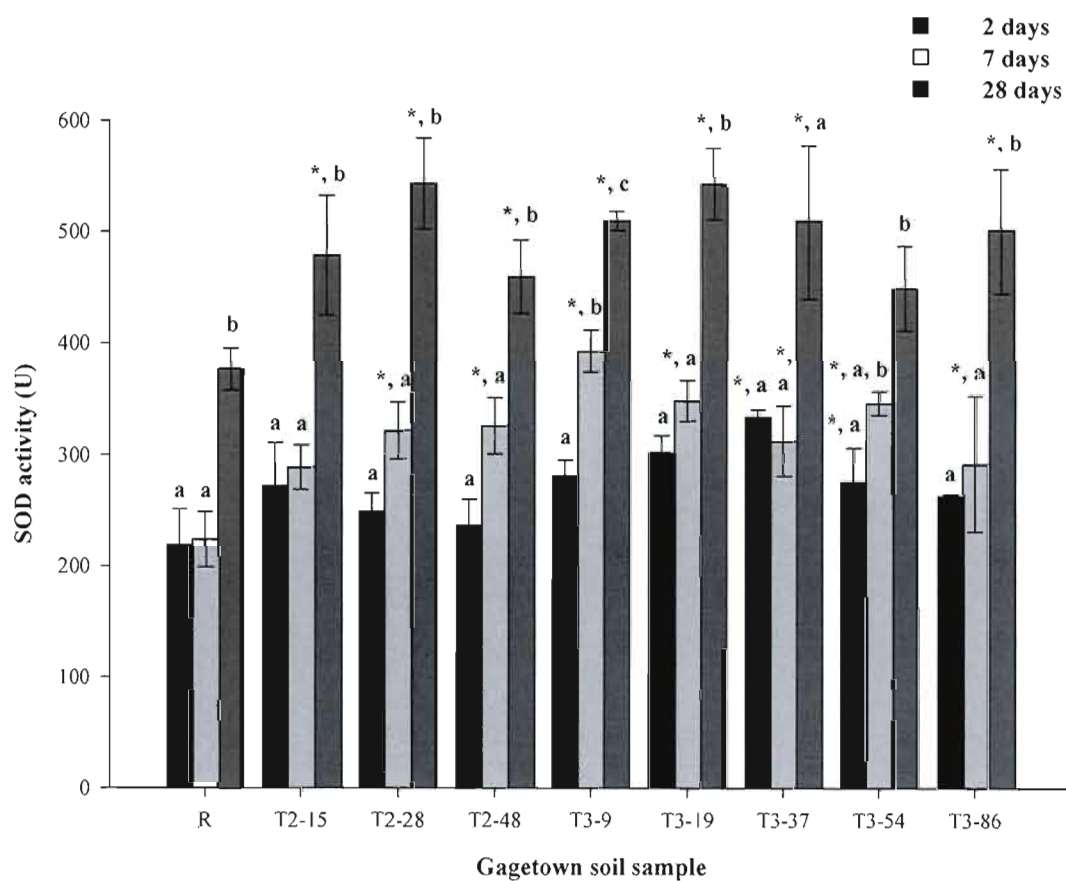


Fig. 3.3

Table 3.1. Physico-chemical characteristics of Gagetown WAT Range soil samples.

Sample	R	T2-15	T2-28	T2-48	T3-9	T3-19	T3-37	T3-54	T3-86
Parameter									
WHC (mL/100 g) ^a	36.75 (2.92)	32.90 (1.04)	55.54 (0.77)	61.10 (0.87)	23.27 (3.22)	22.40 (1.17)	21.73 (2.03)	36.14 (0.56)	40.02 (3.48)
pH ^b	5.49 (0.11)	7.96 (0.09)	7.59 (0.11)	6.70 (0.17)	6.28 (0.10)	6.10 (0.07)	5.85 (0.09)	5.53 (0.07)	5.36 (0.05)
CEC (cmol kg ⁻¹)	13.7	12.2	13.3	16.9	6.6	6.7	6.3	10.7	14.4
Fe _{ox} (%)	0.72	0.87	1.72	4.43	1.41	1.10	0.62	0.50	0.64
Al _{ox} (%)	0.41	0.56	0.97	1.77	0.59	0.62	0.49	0.35	0.42
TOC (%)	2.29	2.18	3.66	5.67	1.51	1.49	1.36	2.52	4.07
Sand (%)	50.4	59.8	52.4	52.2	67.3	63.1	62.5	60.1	51.4
Silt (%)	35.2	28.6	33.7	33.0	25.1	28.1	28.8	28.3	31.9
Clay (%)	14.5	11.5	13.9	14.7	7.6	8.7	8.7	11.6	16.7

Note. WHC: Water Holding Capacity; CEC: Cation Exchange Capacity; TOC: Total Organic Carbon; Al_{ox}: amorphous aluminium oxide; Fe_{ox}: amorphous iron oxide.

^a Data are reported as mean ± (SD), n=3.

^b Results are expressed as mean ± (SD), n=4.

Table 3.2. Energetic compound (EC) and metal contamination profiles of Gagetown WAT Range soils.

Sample	LOQ	R	T2-15	T2-28	T2-48	T3-9	T3-19	T3-37	T3-54	T3-86
Contaminant (mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)									
HMX	0.35	< LOQ	472.9 (20.7)	176.3 (6.5)	77.5 (33.2)	423.4 (90.5)	231.8 (30.2)	30.4 (18.8)	7.3 (1.1)	7.7 (2.6)
Bi	0.02	1.2 (1.6)	38.4 (4.4)	75.2 (12.1)	184.8 (11.3)	39.4 (3.7)	37.8 (3.2)	28.8 (2.9)	60.4 (7.2)	68.6 (6.6)
Cd	0.001	4.0 (0.1)	8.7 (0.5)	18.9 (0.3)	50.7 (2.1)	17.0 (0.5)	14.0 (0.4)	9.4 (0.1)	9.1 (0.3)	10.2 (0.7)
Cr	0.003	18.7 (1.2)	74 (9.9)	132.9 (6.9)	317.0 (138.7)	150.0 (18.9)	85.4 (16.1)	45.7 (1.5)	34.0 (6.0)	37.1 (3.4)
Cu	0.004	3.1 (0.6)	2669.2 (270.4)	4074.9 (19.6)	13728.3 (2354.1)	7926.7 (2541.9)	3186.9 (182.8)	1697.1 (54.6)	1477.6 (41.3)	1563.1 (53.8)
Ni	0.003	2.2 (0.4)	41.0 (7.6)	123.3 (7.4)	397.6 (24.6)	196.1 (23.9)	100.4 (3.7)	47.4 (1.4)	33.4 (2.0)	28.3 (0.5)
Pb	0.02	13.9 (2.1)	249.2 (42.6)	706.1 (55.0)	1963.7 (77.8)	485.4 (80.0)	330.3 (15.6)	245.0 (4.9)	276.9 (11.4)	361.6 (22.3)
Zn	0.0004	26.0 (4.3)	540.9 (48.3)	663.4 (88.3)	1334.0 (295.2)	947.5 (131.3)	647.6 (19.3)	351.1 (31.2)	263.1 (3.8)	245.0 (40.1)

Note. Data are reported as mean \pm (SD), n=3-4. When a contaminant was not detected, results are presented as: < limit of quantification (LOQ) in soil.

Table 3.3. Bioaccessible levels of HMX and metals measured in Gagetown WAT Range soil samples at t=0.

Sample	LOQ	R	T2-15	T2-28	T2-48	T3-9	T3-19	T3-37	T3-54	T3-86
Contaminant (mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)									
HMX	0.70	< LOQ	33.62 (0.42)	27.52 (1.15)	9.96 (0.99)	29.95 (0.47)	33.31 (3.45)	22.74 (4.46)	6.32 (0.08)	4.12 (0.45)
Bi	0.11	0.68 (0.63)	0.97 (0.23)	0.13 (0.11)	0.19 (0.19)	< LOQ	0.92 (0.20)	< LOQ	0.43 (0.53)	0.96 (0.43)
Cd	0.03	0.03 (0.02)	0.05 (0.004)	0.03 (0.001)	0.08 (0.01)	0.09 (0.01)	0.10 (0.02)	0.17 (0.08)	0.46 (0.08)	0.21 (0.14)
Cr	0.02	< LOQ	0.04 (0.05)	0.08 (0.10)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.11 (0.15)	0.16 (0.21)	< LOQ
Cu	0.02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.15 (0.21)	< LOQ	0.77 (1.07)
Ni	0.04	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.04 (0.03)	0.06 (0.06)	0.03 (0.02)	0.10 (0.11)	0.12 (0.13)
Pb	0.05	0.80 (0.07)	0.44 (0.25)	0.68 (0.06)	0.37 (0.15)	0.37 (0.27)	0.95 (0.05)	0.04 (0.02)	0.32 (0.20)	< LOQ
Zn	0.13	< 0.13	< 0.13	< 0.13	1.06 (0.05)	2.32 (0.44)	3.89 (0.82)	6.38 (2.15)	6.90 (1.76)	7.50 (3.92)

Note. Data are reported as equivalent soil concentrations and expressed as mean \pm (SD), n=3. When a contaminant was not detected, results are presented as: < limit of quantification (LOQ) with aqueous KNO₃ extraction.

Table 3.4. Metal body burdens measured in earthworms after 28 days of exposure to Gagetown soil samples.

Sample	LOQ	R	T2-15	T2-28	T2-48	T3-9	T3-19	T3-37	T3-54	T3-86
Contaminant (mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)									
Bi	0.02	19.6 (6.1)	19.6 (10.1)	13.9 (16.6)	8.2 (12.7)	2.3 (3.9)	7.0 (12.2)	22.8 (7.5)	7.2 (12.5)	< LOQ
Cd	0.001	2.2 (0.8)	1.3 (1.3)	5.6 (1.2)	3.0 (2.6)	4.4 (1.0)	3.9 (1.7)	2.2 (2.1)	3.2 (1.3)	0.3 (0.5)
Cr	0.003	6.2 (6.0)	11.1 (10.8)	18.9 (1.3)	24.1 (22.6)	3.4 (5.1)	10.0 (4.3)	9.6 (3.5)	6.2 (5.8)	12.2 (14.2)
Cu	0.004	15.4 (1.5)	131.0 (12.6)	173.4 (123.0)	85.4 (76.5)	187.8 (44.2)	114.5 (36.4)	126.8 (13.6)	204.3 (64.7)	24.1 (41.7)
Ni	0.003	1.7 (2.4)	0.4 (0.3)	9.7 (4.0)	10.7 (3.3)	8.8 (1.0)	0.6 (1.0)	3.2 (3.8)	0.7 (0.6)	< LOQ
Pb	0.02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.6 (1.1)	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Zn	0.0004	72.7 (31.9)	116.8 (22.0)	129.6 (30.3)	125.4 (25.1)	109.8 (9.5)	90.0 (28.6)	89.4 (30.1)	51.5 (48.6)	10.4 (17.9)

Note. Data are reported as mg per kg earthworm tissue (dry weight) and expressed as mean \pm (SD), n=3-4. When a contaminant was not detected, results are presented as: < limit of quantification (LOQ) in earthworm tissue. HMX was below LOQ in all samples (1.01 mg kg⁻¹).

CHAPITRE III

ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DU SOL À L'AIDE DE MODÈLES BASÉS SUR LA BIOACCESSIBILITÉ ET D'UN INDEX DE BIOMARQUEURS

Ce chapitre est publié dans *Environment International* sous le titre suivant :

Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a
biomarker index

Yann Berthelot, Bertin Trottier, Pierre Yves Robidoux.

Environment International (2008), doi:10.1016/j.envint.2008.07.008

3.1 Résumé - Abstract

Résumé :

La biodisponibilité dans des milieux hétérogènes tels que les sols est un concept multifactoriel qui couvre depuis des aspects de la chimie du sol jusqu'à ceux de la toxicité. La complexité de ce facteur a été abordée par diverses études qui ont souligné sa pertinence pour l'extrapolation des données de toxicité du laboratoire au terrain. Comme la biodisponibilité des contaminants sur ces sites est quasiment inconnue, une évaluation globale de cette question a été réalisée avec des sols impactés par des opérations de tir anti-char provenant d'un Champ de Tir et un Secteur d'Entraînement (CTSE) canadien et contaminés par des matériaux énergétiques (ME) et des métaux. Toutefois, les résultats descriptifs obtenus lors de cette étude requiert une analyse complémentaire plus approfondie afin d'améliorer la connaissance de l'état de santé de ces sols. Des modèles statistiques ainsi qu'un indice intégrant les réponses des biomarqueurs ont été développés à partir de cette base de données et sont proposés comme outils diagnostiques, explicatifs et éventuellement prédictifs pour l'évaluation de la biodisponibilité des contaminants et de la qualité des sols. Les relations associant les niveaux de contaminant bioaccessible et les propriétés du sol ont permis de clarifier le comportement des polluants dans les sols contaminés par des matériaux énergétiques. De la même manière, les modèles exprimant la réponse des biomarqueurs en fonction des concentrations de contaminant bioaccessible ont contribué à identifier les toxiques occasionnant la toxicité chez le ver de terre et à la compréhension de ces effets toxiques. L'indice de réponse de biomarqueurs a été adapté à partir de concepts similaires appliqués pour les milieux aquatiques et constitue une contribution originale pour ce qui est des écosystèmes terrestres. Les résultats de l'indice de biomarqueurs concordent avec les profils de contamination des sols et cet indice représente donc un outil intéressant pour l'appréciation de la qualité des sols. Ce genre d'outils présente aussi un potentiel prometteur pour la gestion des sols contaminés.

Mots-clés : Biodisponibilité; Bioaccessibilité; Indice de biomarqueurs; Outil de gestion; Modèle; Qualité du sol

Abstract:

Bioavailability in heterogeneous media such as soils is a multifactorial concept which ranges from soil chemistry to toxicity. The complexity of this factor has been tackled by various studies pinpointing its relevancy for laboratory to field extrapolation of toxicity data. As contaminant bioavailability on these sites is virtually unknown, a global assessment of this issue has been conducted on soils impacted by antitank firing from a Canadian Range and Training Area (RTA) and contaminated by energetic materials (EM) and metals. Yet, the descriptive results acquired from this survey require further in-depth analysis so as to enhance understanding of soil health status. Statistical models as well as an index integrating biomarker responses were derived from this database and are proposed as diagnostic, explanatory and possibly predictive tools for soil bioavailability and quality assessment. Relationships associating bioaccessible contaminant levels to soil properties allowed to clarify contaminant behaviour in energetic material (EM)-contaminated soils. Likewise, models expressing biomarker responses as a function of bioaccessible contaminant concentrations contributed to identify the contaminants causing toxicity in earthworms and to the comprehension of those toxic effects. The index of biomarker response was adapted from similar concepts applied in the aquatic environment and is an original contribution to terrestrial sites. The biomarker index data were in agreement with soil contamination profiles and represent

therefore an interesting tool for soil quality appraisal. Such tools also offer a promising potential for the management of contaminated soils.

Keywords: Bioavailability; Bioaccessibility; Biomarker index; Management tool; Model; Soil quality

3.2 Introduction

Bioavailability is a composite factor integrating both chemical, physiological and toxicological aspects (Lanno et al., 2004). This is particularly true in heterogeneous media like soils. Since bioavailability is a multi-faceted variable involving both chemical and biological aspects, the terminology in this area varies according to the authors (Semple et al., 2004). As described earlier, our contention is that bioaccessibility corresponds to the environmental availability of a contaminant and is a variable of chemical nature whereas bioavailability represents the toxicological bioavailability of a contaminant and is of biological nature in our perception (Berthelot et al., 2008). Studies on contaminated soils show that issues concerning toxicity, bioavailability and ecosystem integrity are varied and complex. For instance, the work of Spurgeon and Hopkin (1995) dealt with the toxic effects on earthworm lethality, growth and reproduction of metals either separately or in mixtures, in amended artificial soil and a polluted soil around a smelting facility. They found that toxic effects of metals were less severe in field soils. It was concluded that bioavailability should explain this outcome. This case illustrates the importance of bioavailability under field conditions and the risks and limitations to extrapolate from laboratory data. Likewise, Robidoux et al. (2004a, b) assessed the toxicity to earthworms of EM-contaminated soils from a military facility by measuring standard toxic effects and a stress biomarker (damage to the lysosomal membrane). They observed that the effects were not quantitatively correlated to the

EM detected in soils (1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine or HMX), nor were they consistent with previous laboratory investigations on soils amended with the pure compound (Robidoux et al., 2001, 2002). HMX bioavailability was here also invoked as a possible cause of the lack of correlation between the recorded toxicity and HMX concentrations. However, as pointed out by Robidoux et al. (2004a), metals are likely to have contributed to the toxicity of the EM-contaminated soils as well but their bioavailability in this type of soil is unknown. One causal factor of bioavailability is the historical nature of contamination in field soils; *i.e.*, bioavailability will decrease with time (Alexander, 2000). Consequently, neglecting bioavailability can lead to an overestimation of risks which in turn may engender a waste of energy and expenses for undeserved actions (Ehlers and Luty, 2003; Bradham et al., 2006).

The bioavailability assessment reported earlier (Berthelot et al., 2008) with soils from an antitank firing range indicated that HMX and several metals were bioaccessible and exerted toxic effects on earthworms. This survey indicated that those military soils may constitute an environmental risk and contributed to identify potentially problematic substances. However, there is a need for deeper and integrating analysis techniques in order to obtain an enhanced comprehension of the causes and consequences of bioavailability in EM-contaminated soils. Modelling can be a good tool to deal with this multifactorial situation and for the integration of composite datasets encompassing an array of diverse variables. This procedure

allows to establish links between the variables at play like those representing bioavailability and constitutes a step towards the elaboration of mechanistic models and tools for bioavailability studies as advocated by the National Research Council (2003). In the first place, relationships may be established between soluble contaminant concentrations and soil characteristics to elucidate toxicant partitioning among soil phases. This phenomenon is fundamental to the bioavailability issue. Developing such models has been a common practice for some time. For example, Janssen et al. (1997) derived equations predicting the partitioning coefficient of metals in 20 soils from major soil properties. Sauvé et al. (2000) performed the same exercise but on a wider database encompassing numerous studies. More recently, Tipping et al. (2003) refined the approach by incorporating the modeled free metallic ion activity in their analysis. All these models have an explanatory and a predictive value which are important for the understanding of contaminant availability in soils and the prediction of potential risks. In addition to these usual models, other relationships can be elaborated, *e.g.* between a biological endpoint and chemical parameters. This kind of models is more interesting from an ecotoxicological point of view. However, to date this approach is seldom adopted. Recently, Bradham et al. (2006) investigated the toxicity of 2000 mg/kg Pb added to different types of soil on the lethality, growth and reproduction of *Eisenia andrei*. They developed models expressing standard biological endpoints as a function of soil properties, thereby integrating implicitly bioavailability.

Weak neutral salt extraction as considered in our assessment and applied in the related study of Berthelot et al. (2008) is a relevant and common technique to determine the bioaccessible (or exchangeable) pool of metals in soils (Gupta and Aten, 1993; Gupta et al., 1996; Houba et al., 1996; Conder and Lanno, 2000; Menzies et al., 2007). In addition to that, it has been demonstrated that the soil solution/dermal route is predominant for contaminant uptake in earthworms, particularly for metals (Saxe et al., 2001; Vijver et al., 2003; Scott-Fordsmand et al., 2004) but also for organic chemicals with low lipophilicity (*i.e.*, $\log K_{ow} < 5$; Belfroid et al., 1995a, b, 1996; Jager et al., 2003). HMX, which has a low $\log K_{ow}$ of 0.06–0.26 falls under this latter category (Talmage et al., 1999; Monteil-Rivera et al., 2003). For example, the toxicity of Cd, Pb and Zn to earthworms was found to be better related to metal concentrations in 0.1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ soil extracts than to total metals levels in metal-spiked artificial soil (Conder and Lanno, 2000) as well as a non-remediated and remediated smelter soil (Conder et al., 2001). Moreover, soil water extracts have also been used to assess mobile and available HMX fraction to worms (Kuperman et al., 2003; Simini et al., 2003; Robidoux et al., 2004a).

Biomarkers are another class of biological indicators which may be representative of contaminant bioavailability (Lanno et al., 2004). While this seems an attractive perspective, biomarkers are currently not much used for this purpose. The problem is that the use of a suite of markers (*i.e.*, a multi-marker approach) is now recommended to obtain a more representative picture of the health of an organism or

even a population and to prevent misinterpretations (Cajaraville et al., 2000; Dailianis et al., 2003; Handy et al., 2003). But, measuring several biomarkers generates a set of data that may be difficult to synthesize into an overall portrait of the situation. For that purpose, different more or less complex procedures were developed to compute global biomarker indexes which integrate the individual biomarkers and indicate the level of alteration of a site (Narbonne et al., 1999; Chèvre et al., 2003; Dagnino et al., 2007). Usually, index derivation requests large databases and calls for complicated statistical operations, aside from the method of Narbonne et al. (1999). The application of the multi-marker strategy has also been advocated for terrestrial ecosystems (Kammenga et al., 2000; Scott-Fordsmand and Weeks, 2000) but, like any modelling with biological parameters in soil organisms, it also is at an early stage. Further development along these lines is consequently needed to achieve a global understanding of bioavailability in soils and for soil quality assessment.

This paper presents a new analytical approach of the recently reported results (Berthelot et al., 2008) in soils contaminated with EM and metals from a military Range and Training Area (RTA) and provides a biomarker-based index of soil quality. Contaminant bioaccessibility in EM-contaminated soils is analyzed with statistical models based on soil properties and the obtained relationships are compared to literature data. Potential links between toxicant bioaccessibility or tissue concentrations and biomarker responses are also investigated through analogous

models. Finally, a biomarker-based index of soil quality derived using an established technique is proposed.

3.3 Materials and methods

3.3.1 *Datasets*

Models were developed to improve the understanding and the interpretation of strategic data for the soil quality assessment of military RTAs. These models were built upon data acquired for ecotoxicological assessment of soils from the Canadian Forces Base of Gagetown (NB, Canada) and described previously (Berthelot et al., 2008). These data are summarized in Tables 4.1 and 4.2. Table 4.2 indicates the value ranges of the variables upon which models are built, thereby defining their validity limits. Soils were sampled along an oblique transect away from two different tanks from the same RTA: T2 (substations: T2-15; T2-28 and T2-48) and T3 (substations: T3-9; T3-19; T3-37; T3-54 and T3-86). The reference station (R) was selected outside the firing area at 55 m from the firing point. Selected variables for model derivation were: (1) soil physico-chemical properties (sand, silt and clay content, pH, Total Organic Carbon – TOC, amorphous iron and aluminium oxide contents – Fe_{ox} and Al_{ox}), (2) total soil contaminant concentrations at the beginning of the exposure to the contaminated soils – $t = 0$ (metals: Bi, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn determined upon concentrated HNO_3 digestion as well as HMX determined by an acetonitrile soil extraction), (3) bioaccessible metal and soluble HMX levels measured in aqueous weak electrolyte soil extracts at $t = 0$, (4) metal concentrations

in earthworm tissue after 28 days of exposure (HMX not being detected) and, (5) selected biomarkers (NRRT: Neutral Red Retention Time, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase, GST: Glutathione S-Transferase and AP: Acid Phosphatase) assessed after 2, 7 and 28 days of exposure.

3.3.2 *Multiple regression analysis*

Linear multiple regression models were fit to relevant variables. More precisely, regressions were determined for the following pairs of explained and explanatory variables: bioaccessible contaminant concentrations in soil with soil physico-chemical properties and biomarkers against bioaccessible contaminant levels or contaminant tissue concentrations. Angular transformations were performed on variables expressed as proportions to avoid border artifacts (Zar, 1996). When the application conditions were not fulfilled (normality or homogeneity of variance), data were normalized. For that purpose, data were transformed by applying relevant mathematical functions for such type of statistical analyses (Zar, 1996). A stepwise procedure was applied to derive the significant models among those variable sets. The Jump In 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was employed. Only significant models and their constitutive variables are presented.

3.3.3 *Model sensitivity analysis*

The aforementioned models were analyzed for their sensitivity towards potential explanatory variables using the Crystal Ball 4.0 software (Decisioneering, Denver, CO, USA). The following setup was applied to run the simulations: 100000 trials,

Monte-Carlo sampling method, sensitivity analysis. The model sensitivity towards each explanatory variable was expressed as the percent contribution to variance. This procedure allowed to rank the variables according to their sensitivity. Models were then simplified by eliminating minor variables. After appraisal, retained models were the best trade-off between the magnitude of R^2 and simplicity.

3.3.4 *Integrated biomarker response calculation*

An index of biomarker response (IBR) was determined according to the procedure described by Narbonne et al. (1999, 2001) and applied as reported in Banni et al. (2005) and Narbonne et al. (2005). This index was derived from the dataset constituted with the five biomarkers (CAT, SOD, GST, NRRT and AP) assessed after 28 days of laboratory exposure of worms to contaminated soils from the Gagetown military training area. Biomarker data were first checked for possible confounding interrelations between biomarkers used for IBR calculation and analyzed with a one-way ANOVA and Dunnett's test (Table 4.1). Briefly, the mean was calculated for each parameter at each station and a 95% mean confidence interval (CI) was obtained for each biomarker. Then, a response factor (RF, the ratio between the highest and the lowest mean) and a response range (RR, the arithmetic difference between the highest and the lowest mean) were determined. A discriminatory factor was calculated as $DF = (RR+CI)/CI$. This factor served to generate a scale indicating the theoretical number of significant differences among the soils under investigation. This DF was then rounded up to an integral number, the

discriminatory level (DL), through the analysis of significant differences between means. The DL served to establish a scale used to rank each biomarker response according to the number of levels between the lower and the higher mean of the individual stations. For example, each biomarker response must be ranked '1' or '2' when there are two levels and from '1' to '5' if there are five CI increments between lower and higher mean. The biomarker responses were subsequently normalized by deriving an individual biomarker index (BI) for each biomarker value following their rank position by means of the conversion table of Narbonne et al. (1999). The assigned indexes are arbitrary numbers proposed by Narbonne et al. (1999, 2001) to rank biomarkers into the described classification scale. Finally, an integrated biomarker response (IBR) was determined for each station by summing up the individual score of the five biomarkers. The macro developed with the Excel software (Microsoft®) by O. Brack (K.S.I.C. Society, France, olivier.brack@wanadoo.fr) was used to achieve this whole sequence of IBR computation. This index indicates the pollution status of a site according to the following ranges: 0-19 = lightly polluted; 20-29 = moderately polluted; 30-39 = highly polluted; 40-49 = severely polluted and >50 = critically polluted. The discriminating capacity between sites of the different biomarkers was also assessed by calculating the frequency (percentage) of highest individual score for each biomarker, reference soil excluded.

3.4 Results

3.4.1 *Modulation of bioaccessibility by soil physico-chemical properties*

Let us first note that except for HMX ($R^2 = 0.76$, $p = 0.002$), no univocal significant correlations were established between soluble contaminant levels and total soil concentrations. Equations elaborated to identify the soil factors influencing contaminant bioaccessibility are summarized in Table 4.3. From these models, one can conclude that bioaccessible Bi level was correlated positively with total soil Bi concentration, clay content as well as the amount of amorphous iron oxide and inversely correlated with the amount of amorphous aluminium oxide and TOC. In terms of sensitivity analysis, these data yielded the following contribution to variance: TOC accounted for 50.9% of the variability in bioaccessible Bi concentration output, clay content for 24.9%, Bi soil concentration for 12.8%, Fe_{ox} for 7.8% and Al_{ox} for 3.6%. Bioaccessible Ni concentration was modulated positively by total Ni soil concentration plus clay content and inversely correlated with pH as well as the amount of amorphous aluminium oxide. Variation in bioaccessible Ni level was explained at 51% by Al_{ox} , 30% by soil Ni load, 10% by clay content and 9% by pH. Bioaccessible Zn concentration was influenced positively by total soil Zn content but inversely associated to pH and the amount of amorphous iron oxide. In this context, soil Zn level contributed up to 46.4% to bioaccessible Zn concentration variability, pH up to 32.5% and Fe_{ox} to 21.1%. A model was also derived for Cd but it was not consistent and is hence not presented.

Finally, soluble HMX concentration resulted from a positive effect of total soil HMX concentration along with a negative effect of clay content. In this case, the clay proportion accounted for 53.3% of the variability and soil HMX content for 46.7%. The pH and total soil concentrations systematically appeared as main variables governing metal bioaccessibility. Secondary variables were soil texture properties such as TOC, clay content and the amount of amorphous iron and aluminium oxide.

3.4.2 Relationships between biomarker responses and bioaccessibility or tissue concentrations

Models generated to examine the possible association between contaminant bioaccessibility and the investigated biological responses are presented in Table 4.4. No significant relationships were found between biomarker responses and total toxicant concentrations in soil. The SOD activity after 2 days of exposure (SOD-2d) was positively correlated with soluble HMX concentration as well as bioaccessible Zn concentration. Bioaccessible Zn generated 50.6% of the variability in SOD-2d activity while accessible HMX accounted for the remaining 49.4%. After seven days of exposure, soluble HMX concentration contributed positively to the SOD activity (SOD-7d) whereas the effect of bioaccessible Ni (ln-transformed values below 1) and Bi concentrations was negative. In this equation, variability of SOD-7d was influenced at 41.3% by bioaccessible Ni level, 31.9% by soluble HMX concentration and 26.8% by bioaccessible Bi concentration. At 28 days of exposure, a positive correlation between SOD activity and soluble HMX concentration was evidenced.

Accessible HMX concentration was consistently correlated to SOD activity levels through exposure time with similar regression coefficients. Models were also obtained for other biomarkers such as CAT activity after 28 days of exposure (CAT-28d) and AP activity after 7 days of exposure (AP-7d). Since these biomarkers were not very sensitive (Table 4.1) and some models were not well substantiated, they are not reported.

The same linear regression analysis was also performed with body residues and biomarkers. The only significant model obtained is provided in Table 4.4. The SOD-7d was found to be positively correlated to tissue Cu content and negatively to tissue Bi concentration. In this model, tissue Cu concentration produced 67.8% of the variation in SOD-7d while the other 32.2% were provided by Bi tissue concentration. As for the importance of Bi tissue concentration, it was however higher than that of tissue Cu due to its greater coefficient in the equation. A model was also derived for the AP activity after 28 days of exposure (AP-28d). As for the bioaccessible concentrations models, it was omitted because of the poor sensitivity of AP and the inconsistency of the model.

No analogy like consistent patterns or recurrent variables was evidenced across models derived from bioaccessible concentrations or from contaminant body concentrations. It should also be specified that tissue concentrations were neither correlated to total soil toxicant contents nor to bioaccessible levels.

3.4.3 *Integration of biomarker responses*

The individual biomarker responses used to derive the IBR were checked for possible interrelations and none was found. Individual biomarker scores and integrated biomarker response index (IBR) for each site are presented in Fig. 4.1. The global biomarker index distribution revealed that the reference soil sample R together with T3-37 and T3-54 soil samples were among the lowest IBR. These samples were followed by T2-15, T2-28, T2-48, T3-19 and T3-86 with intermediate rates and T3-9, with the highest score, was the most severely impacted soil. The most discriminating markers between sites were NRRT with 50.0% followed by SOD with 37.5%. GST and CAT came out at the last scoring position with 25.0% each and AP had a null rate.

3.5 Discussion

This paper exposes a synthetic analysis of data from soils sampled on an anti-tank training range, consisting in attempts to establish links among soil properties, contaminant bioaccessibility and body burdens, biomarker responses as well as the application of a method to integrate the biomarker responses.

3.5.1 *Bioaccessibility as a function of soil properties*

As cation exchange capacity (CEC) is a measure of the amount of available sorption sites in a soil, it encompasses all sorption components (clay, Fe_{ox} and Al_{ox} plus OM content). Due to this close connection, it was decided to exclude CEC from

the model derivation process, like Janssen et al. (1997). The absence of correlation between bioaccessible metal levels and total soil concentrations illustrates the modifying effect of soil characteristics on contaminant bioavailability. This phenomenon is widely acknowledged (Peijnenburg et al., 1997; Allen, 2002; Peijnenburg and Jager, 2003). Conversely, water-extractable HMX level correlated well with total soil concentration and this may be inherent to the sorption behaviour of HMX in soils. HMX like other EMs sorbs poorly to soils and its sorption pattern is governed by the clay content (Monteil-Rivera et al., 2003; Hatzinger et al., 2004). This is a possible explanation for the concordance between soluble HMX and total soil concentrations, especially since the clay content variations were low in the tank # 2 sample series or followed the opposite trend (*i.e.*, increasing with distance) to that of total HMX in tank 3 samples (Berthelot et al., 2008). Moreover, the model derived for HMX aqueous mobility in Gagetown soils with clay content as the main variable is in agreement with the previous statements concerning the factors controlling HMX solubility (Monteil-Rivera et al., 2003).

For the metals, models were issued for Bi, Ni and Zn. In the derived equations pH emerged as a consistently negative parameter, except for Bi. Our observations concord with the unanimous statement on metal partitioning and behaviour in soils that pH is negatively correlated to metal solubility (Anderson and Christensen, 1988; Janssen et al., 1997; Rieuwerts et al., 1998; Sauvé et al., 2000). Soil pH determines the number of available sorption sites for metals by affecting the soil surface charge

with lower pH meaning less negative binding sites. In addition to that, low soil pH means more H^+ ions in solution which will compete with Me^+ ions for negative binding sites. Thus, the combination of those processes will render metals more soluble at low pH (Sauvé, 2002).

Bi is a rare element whose invertebrate toxicity and behaviour in soils is scarcely characterized (Hou et al., 2006). Contamination of soils by Bi arises from the move to Pb-free technologies (as Pb is a notorious toxicant) and, more specifically, from the substitution of Pb by Bi in shells of small arms ammunition and heavier military arsenal (Fahey and Tsuji, 2006; Hou et al., 2006). The Bi salts involved in the manufacture of common Bi-derived products have very low aqueous solubility (Hammond, 2007). However, the fate of Bi in soils is nearly unknown and it may undergo transformations which could render the element more soluble and available for organisms. Hou et al. (2006) actually established a regression model predicting the mobilizable Bi fraction in clean soils comparable to the equation obtained in our analysis. Certain variables and the direction of their influence were identical across the two models: clay content had a positive effect whereas organic carbon level had a negative contribution. This analogy is consistent with the identification of TOC and clay content as the major variables. The occurrence of Fe_{ox} and Al_{ox} in our equation is consistent with the presence of CEC and surface area in theirs. The pH did not come out in our model whereas it did in Hou et al. (2006). Nevertheless, it should be stressed that the mobilizable fraction defined by these authors encompasses more

metal pools than the exchangeable metal fraction assessed in our work. Additionally, as Bi is chemically closely related to Pb, similar reactions in soil may be expected. As a matter of fact, Janssen et al. (1997) who examined the relationships between metal partition coefficients and soil characteristics determined that the Pb partition coefficient, when normalized to the soil Fe_2O_3 content, was almost insensitive to pH. This finding is further substantiated by the low R^2 and proton coefficient they obtained for the pH-regression. The observation of Janssen et al. (1997) may explain the apparent unsusceptibility of Bi bioaccessibility to pH as indicated by our model. Overall, Bi seems to be efficiently bound by common adsorbing soil phases (*e.g.* organic matter, clay, amorphous metal oxides), like Pb (Farrah and Pickering, 1977; Zimdahl and Skogerboe, 1977; Tipping et al., 2003; Rieuwerts et al, 2006). However, the positive influence of clay level here might be attributed to the fact that clays can be an important Bi reservoir but this remains to be elucidated.

The apparent low importance of pH in the equation obtained for Ni is at first sight surprising and may seem contradictory to what is generally reported in the literature. But, this outcome is probably the result of usual interrelations between soil parameters (Bradham et al., 2006; Rieuwerts et al., 2006). So, the effect of pH may be indirectly mediated through other variables like in Bradham et al. (2006) who established connections between Pb toxicity to earthworms and soil properties and demonstrated that the effects of certain parameters were partly indirect and mediated by other variables. Other known sorption phases also influenced Ni solubility in the

present study. Aside from the classical negative effect on solubility of increasing pH and the positive one of total soil Ni, Al_{ox} content was found to reduce Ni solubility while clay content seems to increase it. Clay as well as Al and Fe oxyhydroxide in soils are known as significant binding fractions for metals like Ni (Anderson and Christensen, 1988; Alloway, 1995a, b; Yin et al., 2002). The influence of Al_{ox} is consistent with this statement (binding of metals) but the positive contribution of clay appears contradictory to its conventional metal-sequestering function as noticeable in the Ni equation by Janssen et al. (1997). This outcome may be due either to interrelation effects or the fact that the clay term in the equation represents the sorbed metal whereas the Al_{ox} term constitutes the active sorption agent since clay minerals are coated with amorphous metal oxides (Yin et al., 2002). The latter hypothesis may be supported by the relative weight of the two parameters in the model (51% for Al_{ox} versus 10% for clay).

Zn bioaccessibility was mainly driven by pH and total Zn load. The pH was an important parameter in the equation, accounting for 32.5% of the variance and up to 78.9% together with total soil Zn. It is in agreement with the behaviour of Zn in soils as reported by other authors (Janssen et al., 1997; McBride et al., 1997; Rieuwerts et al., 1998, 2006; Hobbelen et al., 2006). The last factor in importance which controlled Zn availability is Fe_{ox} and its negative contribution concurs with the sorbing action of Fe_{ox} in soils. No model could be derived for other metals (*e.g.* Cr, Cu and Pb) or was found inconsistent (Cd) and this may be attributed to insufficient

data (many values below detection limits) and/or to their more complex partitioning patterns. The generated models are globally in good agreement with the literature (Janssen et al., 1997; Rieuwerts et al., 1998, 2006; Sauvé et al., 2000). However, these introductory models may be refined by extending the database, then validating them against field-collected data (*e.g.*, in mesocosms).

3.5.2 *Relationships between biomarkers and bioaccessible or tissue concentrations*

Since bioaccessible toxicant levels can be considered as better estimates of chemical availability than total soil loads as advocated in the introduction, an attempt to derive equations linking bioaccessible concentrations and biomarkers responses was made, the latter constituting a biological measure of bioavailability. SOD exhibited the most consistent pattern in time with the coherent contribution of HMX. Its toxicity mechanism in invertebrates is unknown, particularly with respect to oxidative stress and the antioxidant defence system but some insights might be found in the biodegradation pathways. In the known biodegradation pathways, HMX acts as an electron acceptor and could then be considered as an oxidant (Crocker et al., 2006). This might account for the “enhancing” effect of HMX on SOD activity. Alternatively, the HMX influence could be mediated by a degradation metabolite such as nitroso-HMX [NO-HMX] (Fournier et al., 2004). The NO-HMX derivatives are indeed oxidant agents and their formation could promote the generation of reactive oxygen species which in turn might activate or induce SOD (Crocker et al.,

2006). Moreover, other organic compounds such as pesticides were also reported to affect earthworm SOD activity (Luo et al., 1999).

Metals are, for their part, recognized as oxidative stress inducers in laboratory animal and wild species (Regoli et al., 1998; Regoli, 2000; Frenzilli et al., 2004) even if it is equivocal in earthworms (Hønsi et al., 1999; Dhainaut and Scaps, 2001; Łaszczyca et al., 2004). In our assessment, the influence of metals on SOD activity was not consistent unlike that of HMX, with different metals correlating with SOD at the different exposure times and apparently no metal contribution at 28 days. This may be inherent to the difficulty to segregate the effects of a particular metal among a mixture. Nevertheless, the positive influence of Zn on SOD-2d activity might be explained by the fact that SOD seems to occur mostly as Cu,Zn-SOD in *Eisenia* sp. (Hønsi et al., 1999). Concerning SOD-7d activity, the contribution of Bi remains to be elucidated. The absence of well-substantiated models for other biomarkers, such as CAT, GST and AP may be due to the low sensitivity of their response as observed in this study. Surprisingly, no relationship was found between the sensitive NRRT and bioaccessible contaminant concentrations. This situation may result from the fact that NRRT is a generic marker which is known to react to a wide range of chemicals (Svendsen et al., 2004). The contribution of multiple contaminants and the interplay of complex patterns (like contaminant interactions) may have prevented the derivation of a straightforward model.

Internal contaminant concentrations are also regarded as a biological measure of bioavailability as they may represent the bioactive fraction of the contaminant and they may be used within the critical body residue concept (Lanno et al., 2004). In the present analysis, only one equation could be derived for contaminant tissue concentrations. This paucity of relationships may arise from the established capacity of earthworm to store metals in a non-toxic form such as mineral granules (Morgan and Morgan, 1998; Morgan et al., 1999). The positive influence of internal Cu on SOD activity may also be attributed to the prevalence of Cu,Zn-SOD.

3.5.3 *Integrated biomarker response*

A multi-marker approach which consists in the application of a battery of biomarkers is now often recommended (Cajaraville et al., 2000; Kammenga et al., 2000; Scott-Fordsmand and Weeks, 2000; Dailianis et al., 2003; Handy et al., 2003) and has been used extensively in the aquatic environment (Astley et al., 1999; Blaise et al., 2002; Galloway et al., 2004) but only sparingly for terrestrial habitats (Spurgeon et al., 2005). The difficulty associated with multi-marker studies resides in the huge amount of generated data which hinders global interpretation. As a result, various more or less complex techniques have been developed to integrate the biomarker responses into an index (Narbonne et al., 1999; Beliaeff and Burgeot, 2002; Chèvre et al., 2003; Dagnino et al., 2007). As a first attempt to derive such an index from a terrestrial survey, the method of Narbonne et al. (1999) was adopted

due to its relative simplicity and its suitability to the dataset. This approach has been successfully applied in different contexts (Banni et al., 2005; Narbonne et al., 2005).

To our knowledge, this is the first attempt to use this kind of approach in a terrestrial context. Some of the biomarkers (NRRT, AP, SOD) included in our computation of the IBR differed from those considered in Narbonne et al. (1999) and subsequent work whereas the others, related to oxidative stress, were identical (*i.e.*, CAT and GST). The biomarkers monitored both by Narbonne et al. (1999) and in related studies (Banni et al., 2005; Narbonne et al., 2005) were GST and acetylcholinesterase activity in gills and CAT, GST and benzo(*a*)pyrene hydroxylase activity as well as lipid peroxidation level (through malonedialdehyde –MDA– formation) in the digestive gland of sentinel bivalve species. Narbonne et al. (1999) also included the CAT/MDA ratio whereas Banni et al. (2005) added the lipofuscin surface density as a biomarker.

The global index distribution reveals that T3-9 was the most impacted site whereas the reference R and T3-54 were least affected and the other stations had intermediate scores. This pattern is generally in agreement with the chemical contamination data reported earlier (Berthelot et al., 2008). The calculated IBR appears therefore as a good indicator of soil quality status. Like in Astley et al. (1999) and Galloway et al. (2004), a discriminating potential between the sites was determined for the biomarkers. The most discriminating markers were NRRT and SOD whereas the least was AP and this is consistent with the response patterns and

the relative sensitivity of biomarkers recorded by Berthelot et al. (2008) following exposure of earthworms to Gagetown soils. They indeed found that NRRT and SOD were the most sensitive markers. The discriminating capacity ranking of the biomarkers is also in agreement with the predominant contributions of NRRT and SOD to the IBR scores (Fig. 4.1). It has been demonstrated that NRRT is a workable earthworm biomarker, which responds to the presence of most contaminants, both in laboratory and field conditions (Svendsen et al., 2004; Sanchez-Hernandez, 2006) and is predictive of effects at higher levels of biological organization (Scott-Fordsmand and Weeks, 2000). Moreover, this biomarker has already been applied to soils from an RTA analogous to the area considered in this study (Robidoux et al., 2004a, b). Along with that, it should also be pointed out that the IBR distribution is comparable to that of NRRT, notably in T3 soils. The latter observation can be attributed to the sensitivity of NRRT which is endowed with a predominant share in the IBR as indicated previously. The correspondence of NRRT and IBR patterns corroborates the value of NRRT as biomarker. As for SOD, the response pattern recorded by Berthelot et al. (2008) is something new with earthworms (Hønsi et al., 1999; Łaszczyca et al., 2004), but the ranking of this biomarker is in agreement with our previously reported results. The last position of AP in the discriminating performance ranking may be explained either by the lack of sensitivity of this marker or by the protocol used in this case, which assesses whole cytosolic AP as opposed to lysosomal AP (Hønsi and Stenersen, 2000). In view of the obtained results, global

biomarker indexes and similar approaches appear as promising tools to assess soil health status and for the management of soil contamination and remediation.

3.6 Conclusion

Relationships were established between contaminant bioaccessibility and soil properties elucidating the behaviour of HMX and metals in EM-contaminated soils. This revisiting of the data collected within the frame of the bioavailability and toxicity assessment of soils from a military RTA provided a new insight into soil quality assessment through an integrated approach. This scrutiny based on models resulted in a better understanding of processes underlying bioavailability in soils from military areas and in the development of a synthetic and intuitive tool indicating soil quality.

The role of some major factors like pH and amorphous metal oxides towards metals or clays towards HMX was substantiated for the studied soils. Other models were derived expressing biomarker responses as a function of either contaminant bioaccessibilities or tissue concentrations. The main finding was that bioaccessible HMX concentration was consistently related to SOD at the different exposure times. HMX might then be involved in oxidative stress in earthworms. This kind of models has the potential to serve as predictors of toxicant bioaccessibility in military soils or bioavailability in targeted species, particularly if expanded to other military sites.

An index of biomarker response incorporating all five biomarkers was also determined by applying a procedure used for aquatic organisms. This is the first attempt to derive such an index for contaminated soils. The index results were consistent with the contamination levels of the soil samples and with previous biomarker data, since the two most responsive biomarkers –SOD and NRRT– were also the most discriminating among soils. These results stress the relevancy of SOD and NRRT as biomarkers signalling exposure to EM-contaminated soils and of the biomarker index as a soil quality indicator. The tools developed here concerning the bioavailability issue have promising perspectives for soil quality assessment and management of contaminated sites, particularly on RTA. Since the application of these tools constitutes a first step, it holds validity only for the investigated military base. It should also be stressed that the associated tools applied in the present study to assess bioavailability (such as the biomarker index) should be used in conjunction with a suite of judiciously chosen tools. The elaboration of such tools should therefore be promoted and further work has still to be done to test, refine and validate these.

3.7 Acknowledgements

We thank Olivier Champeau from Landcare Research (New Zealand) for his help with the derivation of biomarker indexes and Christelle Clérandeau from the “Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels” (Bordeaux, France) for the valuable guidance concerning the indexes as well as Drs. Sonia Thiboutot and

Guy Ampleman from Defence Research and Development Canada – Valcartier
(Canadian Ministry of National Defence) for their support of the project.

3.8 References

- Alexander, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol.* 34:4259–4265; 2000.
- Allen, H.E. Terrestrial ecosystems: an overview. In: Allen, H.E., ed. *Bioavailability of Metals in Terrestrials Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants*. Pensacola, FL, USA: SETAC; 2002. pp. 1-7.
- Alloway, B.J. Soil processes and the behaviour of metals. In: Alloway, B.J., ed. *Heavy Metals in Soils*, Second edition. London, UK: Blackie Academic; 1995a. pp. 11-37.
- Alloway, B.J. Cadmium. In: Alloway, B.J., ed. *Heavy Metals in Soils*, Second edition. London, UK: Blackie Academic; 1995b. pp. 122-151.
- Anderson, P.R.; Christensen T.H. Distribution coefficients of Cd, Co, Ni and Zn in soils. *J Soil Sci.* 39:15–22; 1988.
- Astley, K.N.; Meigh, H.C.; Glegg, G.A.; Braven, J.; Depledge, M.H. Multi-variate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees estuary (UK). *Mar Pollut Bull.* 39:145-154; 1999.
- Banni, M.; Jebali, J.; Daubèze, M.; Clérandeau, C.; Guerbej, H.; Narbonne, J.-F.; Boussetta, H. Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers* 10(2):105-116; 2005.

- Belfroid, A.; Seinen, W.; van Gestel, K.; Hermens, J.; van Leeuwen, K. Modelling the accumulation of hydrophobic organic chemicals in earthworms: Application of the equilibrium partitioning theory. *Environ Sci Pollut Res.* 2:5-15; 1995a.
- Belfroid, A.; Seinen, W.; van den Berg, M.; Hermens, J.; van Gestel, K. Uptake, bioavailability and elimination of hydrophobic compounds in earthworms (*Eisenia andrei*) in field-contaminated soil. *Environ Toxicol Chem.* 14:605-612; 1995b.
- Belfroid, A.C.; Sijm, D.T.H.M.; van Gestel, C.A.M. Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environ Rev.* 4:276-299; 1996.
- Beliaeff, B.; Burgeot, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 21:1316-1322; 2002.
- Berthelot, Y.; Valton, E.; Auroy, A.; Trottier, B.; Robidoux, P.Y. Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils. *Chemosphere.* doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.056; 2008.
- Blaise, C.; Gagné, F.; Pellerin, J.; Hansen, P.D.; Trottier, S. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environ Toxicol.* 17:170-186; 2002

Bradham, K.D.; Dayton, E.A.; Basta, N.T.; Schroder, J.; Payton, M.; Lanno, R.P.

Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms.

Environ Toxicol Chem. 25:769-775; 2006.

Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A.

The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach. Sci Total Environ. 247:295-311; 2000.

Chèvre, N.; Gagné, F.; Blaise, C. Development of a biomarker-based index for

assessing the ecotoxic potential of aquatic sites. Biomarkers. 8:287-298; 2003.

Conder, J.M.; Lanno, R.P. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and

zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. Chemosphere. 41:1659-1668; 2000.

Conder, J.M.; Lanno, R.P.; Basta, N.T. Assessment of metal availability in smelter

soil using earthworms and chemical extractions. J Environ Qual. 30:1231-1237; 2001.

Crocker, F.H.; Indest, K.J.; Fredrickson, H.L. Biodegradation of the cyclic nitramine

explosives RDX, HMX, and CL-20. Appl Microbiol Biotechnol. 73:274-290; 2006.

Dagnino, A.; Allen, J.I.; Moore, M.N.; Kroeg, K.; Canesi, L.; Viarengo, A.

Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. Biomarkers 12(2):155-172; 2007.

Dailianis, S.; Domouhtsidou, G.P.; Raftopoulou, E.; Kaloyianni, M.; Dimitriadis,

V.K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test,

- acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Mar Environ Res. 56:443-470; 2003.
- Dhainaut, A.; Scaps, P. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. Can J Zool. 79:233-253; 2001.
- Ehlers, L.J.; Luthy, R.G. Contaminant bioavailability in soil and sediment. Environ Sci Technol. 37: 295A–302A; 2003.
- Fahey, N.S.C.; Tsuji, L.J.S. Is there a need to re-examine the approval of bismuth shotshell as a non-toxic alternative to lead based on the precautionary principle? J Environ Monitor. 8:1190-1194; 2006.
- Farrah, H; Pickering, B. The sorption of lead and cadmium species by clay minerals. Austr J Chem. 30:1417–1422; 1977.
- Fournier, D.; Halasz, A.; Thiboutot, S.; Ampleman, G.; Manno, D.; Hawari, J.; Biodegradation of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) by *Phanerochaete chrysosporium*: new insight into the degradation pathway. Environ Sci Technol. 38:4130–4133; 2004.
- Frenzilli, G.; Bocchetti, R.; Pagliarecci, M.; Nigro, M.; Annarumma, F.; Scarcelli, V.; Fattorini, D.; Regoli, F. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. Mar Environ Res. 58:609-613; 2004.

- Galloway, T.S.; Brown, R.J.; Browne, M.A.; Dissanayake, A.; Lowe, D.; Jones, M.B.; Depledge, M.H. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ Sci Technol.* 38:1723-1731; 2004.
- Gupta, S.K.; Aten, C. Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils. *Int J Environ Anal Chem.* 51:25-46; 1993.
- Gupta, S.K.; Vollmer, M.K.; Krebs, R. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *Sci Total Environ.* 178:11-20; 1996.
- Hammond, C.R. The elements. In: Lide, D.R., ed. *Handbook of Chemistry and Physics*, 87th edition. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2007. pp. 4.1-4.42.
- Handy, R.D.; Galloway, T.S.; Depledge, M.H. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12:331-343; 2003.
- Hatzinger, P.B.; Fuller, M.E.; Rungmakol, D.; Schuster, R.L.; Steffan, R.J. Enhancing the attenuation of explosives in surface soils at military facilities: sorption-desorption isotherms. *Environ Toxicol Chem.* 23:306-312; 2004.
- Hobbelen, P.H.F.; Koolhaas, J.E.; van Gestel, C.A.M. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environ Pollut.* 144:639-646; 2006.

- Hou, H.; Takamatsu, T.; Koshikawa, K.; Hosomi, M. Concentrations of Ag, In, Sn, Sb and Bi, and their chemical fractionation in typical soils in Japan. *Eur J Soil Sci.* 57:214-227; 2006.
- Houba, V.J.G.; Lexmond, Th.M.; Novozamsky, I.; van der Lee, J.J. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci. Total Environ.* 178:21-28; 1996.
- Hønsi, T.G.; Hoel, L.; Stenersen, J.V. Non-inducibility of antioxidant enzymes in the earthworms *Eisenia veneta* and *E. fetida* after exposure to heavy metals and paraquat. *Pedobiologia* 43:652-657; 1999.
- Hønsi, T.G.; Stenersen, J. Activity and localisation of the lysosomal marker enzymes acid phosphatase, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, and β -galactosidase in the earthworms *Eisenia fetida* and *E. veneta*. *Comp Biochem Physiol.* 125B:429-437; 2000.
- Jager, T.; Fleuren, R.H.L.J.; Hogendoorn, E.A.; De Korte, G. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ Sci Technol.* 37:3399-3404; 2003.
- Janssen, R.P.T.; Posthuma, L.; Baerselman, R.; Den Hollander, H.A.; Van Veen, R.P.M.; Peijnenburg, W.J.G.M. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. I. Relationships between metal partition coefficients and soil characteristics. *Environ Toxicol Chem.* 16:2470-2478; 1997.
- Kammenga, J.E.; Dallinger, R.; Donker, M.H.; Köhler, H.R.; Simonsen, V.; Triebkorn, R.; Weeks, J.M. Biomarkers in terrestrial invertebrates for

- ecotoxicological soil risk assessment. *Rev Environ Contam Toxicol.* 164:93-147; 2000.
- Kuperman, R.G.; Checkai R.T.; Simini, M.; Phillips, C.T.; Kolakowski, J.E.; Curnas, C.W.; Sunahara, G.I. Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia.* 47:651-656; 2003.
- Lanno, R.; Wells, J.; Conder, J.; Bradham, K.; Basta, N. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol Environ Saf.* 57:39-47; 2004.
- Łaszczyca, P.; Augustyniak, M.; Babczynska, A.; Bednarska, K.; Kafel, A.; Migula, P.L.; Wilczek, G.; Witas, I. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environ Int.* 30:901-910; 2004.
- Luo, Y.; Zang, Y.; Zhong, Y.; Kong, Z. Toxicological study of two novel pesticides on *Eisenia foetida*. *Chemosphere* 39:2347-2356; 1999.
- McBride, M.; Sauvé, S.; Hendershot, W. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *Eur J Soil Sci.*48:337-346; 1997.
- Menzies, N.W.; Donn, M.J.; Kopittke, P.M. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environ. Pollut.* 145:121-130; 2007.

- Monteil-Rivera, F.; Groom, C.; Hawari, J. Sorption and degradation of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in Soil. *Environ Sci Technol.* 37:3878-3884; 2003.
- Morgan, J.E.; Morgan, A.J. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. *Environ Pollut.* 99:167–175; 1998.
- Morgan, A.J.; Sturzenbaum, S.R.; Winters, C.; Kille, P. Cellular and molecular aspects of metal sequestration and toxicity in earthworms. *Invertebr Reprod Dev.* 36:17–24, 1999
- Narbonne, J.-F.; Daubèze, M.; Clérendeau, C.; Garrigues, P. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* 4:415-424; 1999.
- Narbonne, J.-F.; Daubeze, M.; Baumard, P.; Budzinski, H.; Clérendeau, C.; Akcha, F.; Mora, P.; Garrigues, P. Biochemical markers in mussel, *Mytilus* sp., and pollution monitoring in European coasts: data analysis. In: Garrigues, P.; Barth, H.; Walker, C.H.; Narbonne, J.-F., eds. *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science; 2001. pp. 216-236.
- Narbonne, J.-F.; Aarab, N.; Clérendeau, C.; Daubèze, M.; Narbonne, J.; Champeau, O.; Garrigues, P. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers* 10(1):58-71; 2005.

- National Research Council (NRC). Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools and Applications. Washington, D.C., USA: National Academies Press; 2003.
- Peijnenburg, W.J.G.M.; Posthuma, L.; Eijsackers, H.J.P.; Allen, H.E. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 37:163-172; 1997.
- Peijnenburg, W.J.G.M.; Jager, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicol Environ Saf.* 56:63-77; 2003.
- Regoli, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol.* 50:351-361; 2000.
- Regoli, F.; Nigro, M.; Orlando, E. Lysosomal and antioxydant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol.* 40:375-392; 1998.
- Rieuwerts, J.S.; Ashmore, M.R.; Farago, M.E.; Thornton, I. The influence of soil characteristics on the extractability of Cd, Pb and Zn in upland and moorland soils. *Sci Total Environ.* 366:864-875; 2006.
- Rieuwerts, J.S.; Thornton, I.; Farago, M.E.; Ashmore, M.R. Quantifying the influence of soil properties on the solubility of metals by predictive modelling of secondary data. *Chem Speciation Bioavailability.* 10:83-94; 1998.

- Robidoux, P.Y.; Gong, P.; Sarrazin, M.; Bardai, G.; Paquet, L.; Hawari, J.; Dubois, C.; Sunahara, G.I. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. *Ecotoxicol Environ Saf.* 58:300-313; 2004a.
- Robidoux, P.Y.; Dubois, C.; Hawari, J.; Sunahara, G.I. Assessment of soil toxicity from an antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei* in mesocosms and laboratory studies. *Ecotoxicology* 13:603-614; 2004b.
- Robidoux, P.Y.; Hawari, J.; Thiboutot, S.; Sunahara, G.I. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ Pollut.* 111:283-292; 2001.
- Robidoux, P.Y.; Hawari, J.; Bardai, G.; Paquet, L.; Ampleman, G.; Thiboutot, S.; Sunahara, G.I. TNT, RDX and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil. *Arch Environ Contam Toxicol.* 43:379-388; 2002.
- Sanchez-Hernandez, J.C. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev Environ Contam Toxicol.* 188:85-126; 2006
- Sauvé, S. Speciation of metals in soils. In: Allen, HE, ed. *Bioavailability of Metals in Terrestrials Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants*. Pensacola, FL, USA: SETAC; 2002. pp. 7-37.

- Sauvé, S.; Hendershot, W.A.; Allen, H.E. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden and organic matter. *Environ Sci Technol.* 34:1125-1131; 2000.
- Saxe, J.K.; Impellitteri, C.A.; Peijnenburg, W.J.G.M.; Allen, H.E. A novel model describing heavy metal concentrations in the earthworm, *Eisenia andrei*. *Environ Sci Technol.* 35: 4522-4529; 2001.
- Scott-Fordsmand, J.J.; Weeks, J.M. Biomarkers in earthworms. *Rev Environ Contam Toxicol.* 165:117-159; 2000.
- Scott-Fordsmand, J.J.; Stevens, D.; McLaughlin, M. Do earthworms mobilize fixed zinc from ingested soil? *Environ Sci Technol.* 38:3036-3039; 2004.
- Semple, K.T.; Doick, K.J.; Jones, K.C.; Burauel, P.; Craven, A.; Harms, H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ Sci Technol.* 38:228A-231A; 2004.
- Simini, M.; Checkai, R.T.; Kuperman, R.G.; Phillips, C.T.; Kolakowski, J.E.; Kurnas, C.W.; Sunahara, G.I. Reproduction and survival of *Eisenia fetida* in a sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia.* 47, 657-662; 2003.
- Spurgeon, D.J.; Hopkin, S.P. Extrapolation of the laboratory based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology* 4:190-205; 1995.

- Spurgeon, D.J.; Ricketts, H.; Svendsen, C.; Morgan, A.J.; Kille, P. Hierarchical responses of soil invertebrates (earthworms) to toxic metal stress. *Environ Sci Technol.* 39:5327-5334; 2005.
- Svendsen, C.; Spurgeon, D.J.; Hankard, P.K.; Weeks, J.M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: Is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol Environ Saf.* 57:20-29; 2004.
- Talmage, S.S.; Opresko, D.M.; Maxwell, C.J.; Welsh, C.J.E.; Cretella, F.M.; Reno, P.H.; Daniel, F.B. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Rev Environ Contam Toxicol.* 161:1-156; 1999.
- Tipping, E.; Rieuwerts, J.; Pan, G.; Ashmore, M.R.; Loftis, S.; Hill, M.T.R. The solid-solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) in upland soils of England and Wales. *Environ Pollut.* 125:213-225; 2003.
- Vijver, M.G.; Vink, J.P.M.; Miermans, C.J.H.; Van Gestel, C.A.M. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biol Biochem.* 35:125-132; 2003.
- Yin, Y.; Impellitteri, C.A.; You, S.-J.; Allen, H.E. The importance of organic matter distribution and extract soil/solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *Sci Total Environ.* 287:107-119; 2002.
- Zar, J. H. Biostatistical analysis. Third edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 1996.
- Zimdahl, R.L.; Skogerboe, R.K. Behaviour of lead in soil. *Environ Sci Technol.* 11:1202-1207; 1977.

Table 4.1. Summary of biomarker data acquired upon exposure of *Eisenia andrei* to contaminated soils from the Wellington antitank firing range (WAT) on the Canadian Forces Base at Gagetown (NB, Canada). Data is expressed as mean \pm SE, n = 4.

Soil sample	R	T2-15	T2-28	T2-48	T3-9	T3-19	T3-37	T3-54	T3-86
Parameter									
NRRT-28d (min)	35.8 (\pm 3.0)	22.5 (\pm 4.4) *	17.0 (\pm 3.8) *	10.5 (\pm 1.8) *	11.9 (\pm 1.8) *	8.3 (\pm 1.7) *	17.4 (\pm 2.1) *	18.7 (\pm 2.2) *	26.0 (\pm 6.1)
SOD-2d (U)	218.7 (\pm 32.5)	272.1 (\pm 38.5)	249.0 (\pm 16.6)	236.5 (\pm 23.8)	281.4 (\pm 14.1)	301.9 (\pm 15.2)	333.7 (\pm 6.8) *	275.7 (\pm 30.6) *	262.6 (\pm 1.9)
SOD-7d (U)	223.8 (\pm 24.9)	288.6 (\pm 20.0)	321.5 (\pm 25.5) *	325.8 (\pm 25.1) *	393.0 (\pm 19.0) *	348.1 (\pm 18.4) *	312.2 (\pm 31.7) *	346.0 (\pm 10.4) *	291.8 (\pm 60.8) *
SOD-28d (U)	376.2 (\pm 19.5)	478.9 (\pm 53.6) *	543.4 (\pm 41.2) *	459.9 (\pm 32.8) *	509.9 (\pm 8.7) *	543.3 (\pm 32.5) *	508.9 (\pm 69.1) *	449.5 (\pm 38.0)	500.8 (\pm 56.2) *
CAT-28d (μ mol/min/mg protein)	164.9 (\pm 5.7)	193.1 (\pm 18.4)	198.8 (\pm 11.6) *	163.4 (\pm 23.0)	185.0 (\pm 6.4)	175.5 (\pm 19.8)	137.1 (\pm 10.2)	173.3 (\pm 19.5)	162.6 (\pm 19.2)
GST-28d (nmol/min/mg protein)	359.5 (\pm 25.9)	354.5 (\pm 7.1)	342.9 (\pm 21.2)	343.0 (\pm 28.2)	374.6 (\pm 24.8)	336.0 (\pm 3.6)	287.3 (\pm 15.4) *	346.5 (\pm 36.2)	383.5 (\pm 24.1)
AP-7d (μ mol/min/mg protein)	1.04 (\pm 0.08)	1.27 (\pm 0.10)	1.21 (\pm 0.09)	1.26 (\pm 0.12)	1.16 (\pm 0.04)	1.24 (\pm 0.18) *	1.70 (\pm 0.30) *	1.27 (\pm 0.10)	1.45 (\pm 0.19) *
AP-28d (μ mol/min/mg protein)	1.02 (\pm 0.02)	0.92 (\pm 0.05)	0.91 (\pm 0.09)	1.17	1.31 (\pm 0.25)	0.85 (\pm 0.05) *	1.05 (\pm 0.17)	0.98 (\pm 0.10)	1.09 (\pm 0.15)

Note. * Significantly different from reference soil R (Dunnett's test, $p < 0.05$); NRRT = Neutral Red Retention Time; SOD = Superoxide dismutase; CAT = Catalase; GST = Glutathion-S-transferase; AP = Acid Phosphatase. NRRT-28d: NRRT after 28 days of exposure; SOD-2d: SOD activity after 2 days of exposure; SOD-7d: SOD activity after 7 days of exposure; SOD-28d: SOD activity after 28 days of exposure; CAT-28d: CAT activity after 28 days of exposure; GST-28d: GST activity after 28 days of exposure; AP-7d: AP activity after 7 days of exposure; AP-28d: AP activity after 28 days of exposure.

Table 4.2. Summary of the physico-chemical properties, soil contamination data and *Eisenia andrei* body residues data obtained during the exposure of earthworms to soils from the Wellington antitank firing range (WAT) on the Canadian Forces Base at Gagetown (NB, Canada). Data are reported as ranges (min-max). Adapted from Berthelot et al. (2008).

Parameter	Range
pH	5.36 – 7.96
Fe _{ox} (%)	0.50 – 4.43
Al _{ox} (%)	0.35 – 1.77
TOC (%)	1.36 – 5.67
Clay content (%)	7.6 – 16.7
Total [Bi] (mg/kg)	1.2 – 184.8
Bioaccessible [Bi] (mg/kg)	0.06 – 0.97
Tissue [Bi] (mg/kg)	8.2 – 22.8
Tissue [Cu] (mg/kg)	15.4 – 204.3
Total [Ni] (mg/kg)	2.2 – 397.6
Bioaccessible [Ni] (mg/kg)	0.02 – 0.12
Tissue [Ni] (mg/kg)	0.002 – 10.7
Total [Zn] (mg/kg)	26.0 – 1334.0
Bioaccessible [Zn] (mg/kg)	0.07 – 7.5
Total [HMX] (mg/kg)	0.18 – 472.9
Soluble (aqueous KNO ₃ extractable) [HMX] (mg/kg)	0.35 – 33.6

Note. TOC: Total Organic Carbon; Al_{ox}: amorphous aluminium oxide; Fe_{ox}: amorphous iron oxide.

Table 4.3. Linear multiple regressions between bioaccessible/soluble contaminant concentrations and soil physico-chemical properties (TOC: Total Organic Carbon; Al_{ox} : amorphous aluminium oxide; Fe_{ox} : amorphous iron oxide). $p < 0.05$ for all variables.

Variable (y =)	Model (ax + by + ... + c)	R ²	p	N
Bioaccessible [Bi] =	$0.78 \sqrt{\text{total [Bi]}} (\pm 0.09) + 91 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{clay percentage}/100}) (\pm 9.8) + 62 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{Feox}/100}) (\pm 8.1) - 73 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{Alox}/100}) (\pm 11) - 150 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{TOC}/100}) (\pm 17) - 14 (\pm 1.5)$	0.97	0.0132	9
Bioaccessible [Ni] =	$\exp[0.58 \ln \text{total [Ni]} (\pm 0.12) + 8.0 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{clay percentage}/100}) (\pm 2.6) - 37 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{Alox}/100}) (\pm 7.6) - 0.42 \text{ pH} (\pm 0.12) - 2.8 (\pm 1.1)]$	0.93	0.0158	9
Bioaccessible [Zn] =	$[0.12 \sqrt{\text{total [Zn]}} (\pm 0.04) - 20 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{Feox}/100}) (\pm 7.2) - \text{pH} (\pm 0.25) + 7.6 (\pm 1.4)]^2$	0.83	0.0229	9
Soluble [HMX] =	$3.7 \ln \text{total [HMX]} (\pm 0.97) - 89 \text{ Arcsin} (\sqrt{\text{clay percentage}/100}) (\pm 50) + 37 (\pm 20)$	0.84	0.0037	9

Table 4.4. Linear multiple regressions between biomarker responses and bioaccessible/soluble or tissue contaminant concentrations. Refer to table 4.1 for acronym definitions. $p < 0.05$ for all variables.

Variable (y =)	Model (ax + by + ... + c)	R ²	p	N
SOD-2d =	1.9 soluble [HMX] (± 0.41) + 8.7 bioaccessible [Zn] (± 1.8) + 207 (± 12)	0.86	0.0028	9
SOD-7d =	2.2 soluble [HMX] (± 0.69) + 47 ln bioaccessible [Ni] (± 14) - 71 bioaccessible [Bi] (± 24) + 462 (± 50)	0.82	0.0266	9
SOD-28d =	2.8 soluble [HMX] (± 1) + 433 (± 23)	0.53	0.0270	9
SOD-7d =	0.51 tissue [Cu] (± 0.12) - 3.0 tissue [Bi] (± 0.97) + 290 (± 20)	0.83	0.0045	9

FIGURE CAPTIONS

Fig. 4.1. Global index of biomarker response (IBR) of Gagetown soils. The IBR for each soil corresponds to the cumulative sum of the individual biomarker indexes found in the stacked bars.

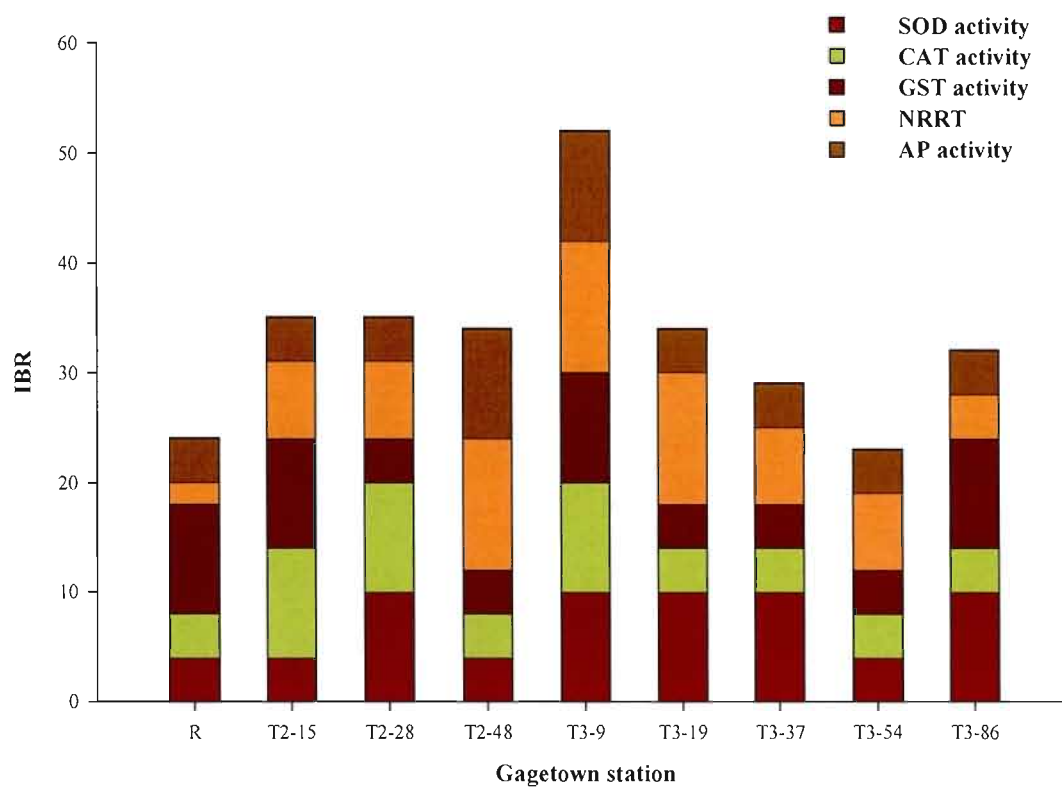


Fig. 4.1

CONCLUSION GÉNÉRALE

La pollution par les métaux et les composés énergétiques des sols voués à un usage militaire est maintenant un phénomène reconnu, notamment au Canada. La toxicité individuelle des métaux pour les récepteurs biologiques potentiels sur ces zones est bien établie et celle des explosifs, quoique moins intensivement étudiée, est maintenant aussi relativement bien documentée. Cependant, la biodisponibilité de ces contaminants dans le sol des terrains militaires demeure quasiment inconnue. Or, cette variable a été identifiée comme un déterminant majeur de la toxicité d'un contaminant exercée *in situ* et donc des risques environnementaux associés à la présence de cette substance dans un milieu donné. Il s'agit par conséquent d'un paramètre qu'il est important de déterminer et de considérer. La connaissance de ce paramètre permettra en effet d'orienter la gestion des sols contaminés par les opérations militaires afin de la rendre plus efficace et optimale, à la fois en matière de coût et d'environnement. Cela étant, la biodisponibilité est une grandeur difficile à évaluer du fait de sa nature composite qui réunit des éléments de chimie de l'environnement et d'écotoxicologie. Une approche holistique de la biodisponibilité combinant des indicateurs biologiques à des outils chimiques apparaissait donc pertinente. Il importait donc de caractériser la biodisponibilité des métaux et des composés énergétiques dans les sols utilisés à des fins militaires et ses déterminants au moyen d'une démarche de type intégré.

Dans le premier chapitre exposant les travaux réalisés, nous avons examiné l'influence du type de sol sur la biodisponibilité et la toxicité du plomb et du HMX, deux polluants représentatifs des sites militaires canadiens, ainsi que l'effet de la présence d'organismes endogés tels que le ver de terre sur la bioaccessibilité de ces contaminants. Pour ce faire, deux sols de nature distincte et amendés avec ces substances ont été comparés dans des conditions contrôlées de laboratoire. Il s'est avéré que le plomb et le HMX étaient tous les deux plus biodisponibles et donc toxiques dans le sol sablonneux sélectionné, avec un potentiel de biodisponibilité *a priori* plus élevé et représentatif du sol retrouvé sur de nombreuses bases militaires canadiennes. D'autre part, l'incidence de l'activité des vers de

terre sur la bioaccessibilité des deux toxiques étudiés était différente selon le contaminant et le type de sol. Ainsi, aucune variation n'a été observée pour le HMX dans les deux sols tandis que la présence de vers diminuait la disponibilité du plomb dans le sol à texture sablonneuse mais l'augmentait légèrement dans le sol forestier. Les conclusions de ce premier volet d'expériences indiquent que la biodisponibilité de contaminants caractéristiques des activités militaires est modulée par la nature du sol et apparaît comme un paramètre important à déterminer dans le cadre d'une évaluation adéquate des risques environnementaux posés par les terrains militaires. En outre, il semble que la bioaccessibilité chimique soit un bon indicateur de la biodisponibilité toxicologique dans des sols amendés avec un contaminant unique en laboratoire.

En second lieu, la biodisponibilité a été analysée dans des échantillons de sol issus d'un périmètre de tir anti-char sur une base d'entraînement militaire au Nouveau-Brunswick. Ces sols représentatifs des types de substrats retrouvés sur les bases canadiennes ont été contaminés *in situ* par le HMX et une série de métaux dont la toxicité est connue pour la plupart d'entre eux. Ces échantillons offraient la possibilité d'évaluer la biodisponibilité des contaminants au sein de sols militaires. A cet effet, des vers ont été exposés à ces sols dans le cadre de tests de toxicité en laboratoire. La biodisponibilité a été appréhendée de manière intégrée, par l'utilisation conjointe d'outils toxicologiques (toxicité classique, concentrations de contaminants dans les tissus et batterie de biomarqueurs) et chimiques (teneurs potentiellement bioaccessibles et totales des composés toxiques dans les sols). Les sols étudiés sont principalement contaminés par le HMX en ce qui concerne les composés énergétiques et par le Cu, le Zn, le Pb, le Bi, le Cr, le Ni et le Cd pour les métaux. Le HMX s'est montré relativement accessible dans les sols en dépit de sa solubilité aqueuse limitée tandis que, parmi les métaux, le Bi, le Pb, le Zn et le Cd se sont avérés les plus bioaccessibles dans les sols au début de l'expérience à la différence du Cr, du Cu et du Ni. Tout comme dans le cas des expériences avec des sols amendés mentionnées précédemment, une augmentation de pH résultant de l'activité des vers a été relevée dans la majorité des sols examinés (substrats initialement acides). Nous présumons que cette fluctuation du pH d'origine biotique a suscité la diminution des teneurs bioaccessibles de Pb, Zn et Cd constatée à la fin de l'expérience. Du point de vue des concentrations dans les tissus de vers, les métaux

prépondérants étaient le Cu, le Zn et le Bi alors que le HMX n'a pas été détecté.

L'accumulation préférentielle des contaminants mentionnés précédemment par rapport aux autres composés a été attribuée à leur profil de bioaccessibilité dans les sols en question, leur métabolisme dans les tissus vivants (*i.e.* régulation) ou l'interférence chimique et/ou biochimique entre éléments (comme dans le cas du Bi et du Pb, deux métaux apparentés qui présentaient des profils contrastants de bioaccessibilité et d'incorporation dans les tissus).

Quant à la toxicité des sols investigués, les résultats obtenus ont indiqué un contexte d'effets sous-létaux, à l'exception d'un sol (le plus contaminé en HMX et en métaux) qui générait une létalité significative. Des réponses de certains biomarqueurs intégrés au sein d'une batterie et sélectionnés comme outils biologiques spécifiques d'évaluation de la biodisponibilité ont aussi été relevées. Ainsi, une fragilisation prononcée de la membrane lysosomiale des coelomocytes a été observée pour plusieurs sols et semble liée au gradient de concentrations de métaux, qui sont reconnus comme d'importants effecteurs de ce type de réponse. De plus, une activation de la SOD s'intensifiant de manière consistante et significative avec le temps d'exposition a été notée avec presque tous les sols. Cette réponse paraît indiquer que les vers subissent un stress oxydant de plus en plus marqué avec le temps. Étant donné les résultats de certaines études qui rapportent que la SOD n'est apparemment pas affectée par les métaux chez les vers de terre, nous avons postulé que le HMX ou l'un de ses métabolites de (bio)dégradation pourraient être la source de l'effet obtenu sur la SOD.

Cette seconde partie des investigations portant sur un cas réel avec des sols d'une base militaire contaminés *in situ* met en évidence l'intérêt d'utiliser une approche intégrée combinant différents outils scientifiques pour l'évaluation de la biodisponibilité dans les sols contaminés par les activités militaires. Ainsi, les résultats obtenus indiquent la nécessité et la pertinence des outils biologiques pour évaluer la biodisponibilité convenablement dans ce type de sol car les outils chimiques utilisés n'en ont pas permis une prédiction adéquate. Ce type d'approche peut contribuer à déterminer les profils de biodisponibilité des substances présentes et ainsi repérer les contaminants problématiques dans une situation réelle et complexe.

Finalement, dans le dernier chapitre, les données générées lors de l'exposition aux sols de terrain précédemment mentionnés ont été analysées à l'aide d'outils mathématiques plus élaborés afin de dégager des relations entre les divers déterminants de la biodisponibilité ainsi qu'une perspective synthétique de la biodisponibilité dans ce genre de sol. Dans ce sens, des modèles de régression linéaires ont été établis pour différentes paires de variables pertinentes. Afin d'élucider le rôle des propriétés physico-chimiques du sol comme modulateurs de la bioaccessibilité des contaminants, de tels modèles ont été testés entre lesdites propriétés et les teneurs bioaccessibles de chaque toxique. Des faits établis dans la littérature tels que l'influence négative du pH du sol sur la bioaccessibilité du Bi, du Ni et du Zn (relation inverse) ou le rôle de séquestration du Bi, du Ni et du Zn et du HMX tenu par plusieurs constituants du sol (argiles, matière organique, oxydes métalliques) ont été corroborés pour des sols représentatifs de zones d'activités militaires. L'effet négatif de la teneur en argile du sol sur la concentration de HMX accessible s'est également vérifié. D'autre part, des relations ont aussi été dégagées entre les teneurs de toxiques bioaccessibles et les réponses des biomarqueurs mesurés aux différents temps d'exposition. A cet égard, l'observation la plus marquante est la présence récurrente de la concentration du HMX soluble parmi les variables explicatives de l'activité de la SOD aux différents temps d'exposition. Ce résultat vient étayer l'hypothèse antérieurement exposée selon laquelle le HMX pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'activité de la SOD chez les vers et donc du stress oxydant vraisemblablement encouru. Enfin, une méthode existante a été appliquée en exclusivité avec des sols pour dériver un indice global de biomarqueurs à partir des données obtenues lors de l'exposition aux sols issus de la base militaire étudiée dans l'optique de générer un indicateur synthétique de la qualité des sols en question. Dans l'ensemble, les valeurs d'indice obtenues pour chaque échantillon se sont avérées représentatives de la qualité environnementale des sols visés, avec le sol référence R ainsi que les sols les moins contaminés T3-37 et T3-54 ayant les indices les plus faibles tandis que les sols les plus fortement contaminés (ceux de la série T2 et le sol T3-9) présentaient les indices les plus élevés. En outre, la SOD et la fragilité de la membrane lysosomiale par mesure du temps de rétention du rouge neutre se sont trouvées être les biomarqueurs avec le plus fort potentiel de discrimination inter-site. Ce résultat est conforme au profil de réponse obtenu pour ces deux biomarqueurs suite à

l'exposition aux sols évoquée plus haut en comparaison avec ceux observés pour les autres biomarqueurs.

Cette nouvelle analyse avec des outils plus poussés des données générées avec une matrice contaminée complexe mais représentative a permis d'envisager les résultats sous un jour nouveau en extrayant des corrélations entre les différentes mesures de biodisponibilité. Par ailleurs, l'utilisation inédite pour des sols d'une procédure servant à compiler un indice global de biomarqueurs reflétant le statut de pollution du sol et dans une certaine mesure, la biodisponibilité des contaminants s'est révélée fructueuse et semble intéressante à l'avenir pour l'évaluation de la qualité des sols dans un contexte de contamination multiple et potentiellement pour la gestion des sols militaires.

En définitive, les investigations menées dans le cadre de cette recherche doctorale ont permis de mieux cerner la biodisponibilité des contaminants dans des sols utilisés à des fins militaires ainsi que ses déterminants. L'utilisation d'une approche holistique alliant des outils représentatifs des principaux processus de biodisponibilité s'est avérée profitable pour déterminer ce paramètre complexe de manière adéquate. Ce type de démarche s'appuyant sur une batterie d'outils différents mais complémentaires pour évaluer la biodisponibilité dans les sols concorde avec les recommandations formulées par le NRC (2003). Aussi, bien qu'empiriques, les modèles développés dans le cadre de cette étude sont une avancée dans la compréhension des processus qui sous-tendent la biodisponibilité et vers l'élaboration de modèles mécanistiques basés sur une causalité établie. Contrairement à l'hypothèse de travail initiale qui stipulait que les substances retrouvées dans les sols contaminés par des composés énergétiques seraient peu biodisponibles en raison de leurs propriétés ou de la forme sous laquelle elles sont introduites dans le milieu, nos résultats mettent en évidence que plusieurs de ces contaminants, dont le HMX, peuvent se retrouver biodisponibles et générer des risques pour les récepteurs biologiques. Toutefois, des investigations supplémentaires devraient être menées pour vérifier et affiner les résultats obtenus dans cette étude. Ainsi, plusieurs autres sols issus de sites correspondant à différents types d'opérations militaires représentatives

devraient être considérés. Ultimement, des essais *in situ* (*i.e.* avec des mésocosmes) sont souhaitables pour valider l'approche et les données de laboratoire.

ANNEXE A

LOCALISATION DE LA BASE DES FORCES CANADIENNES (BFC)
GAGETOWN

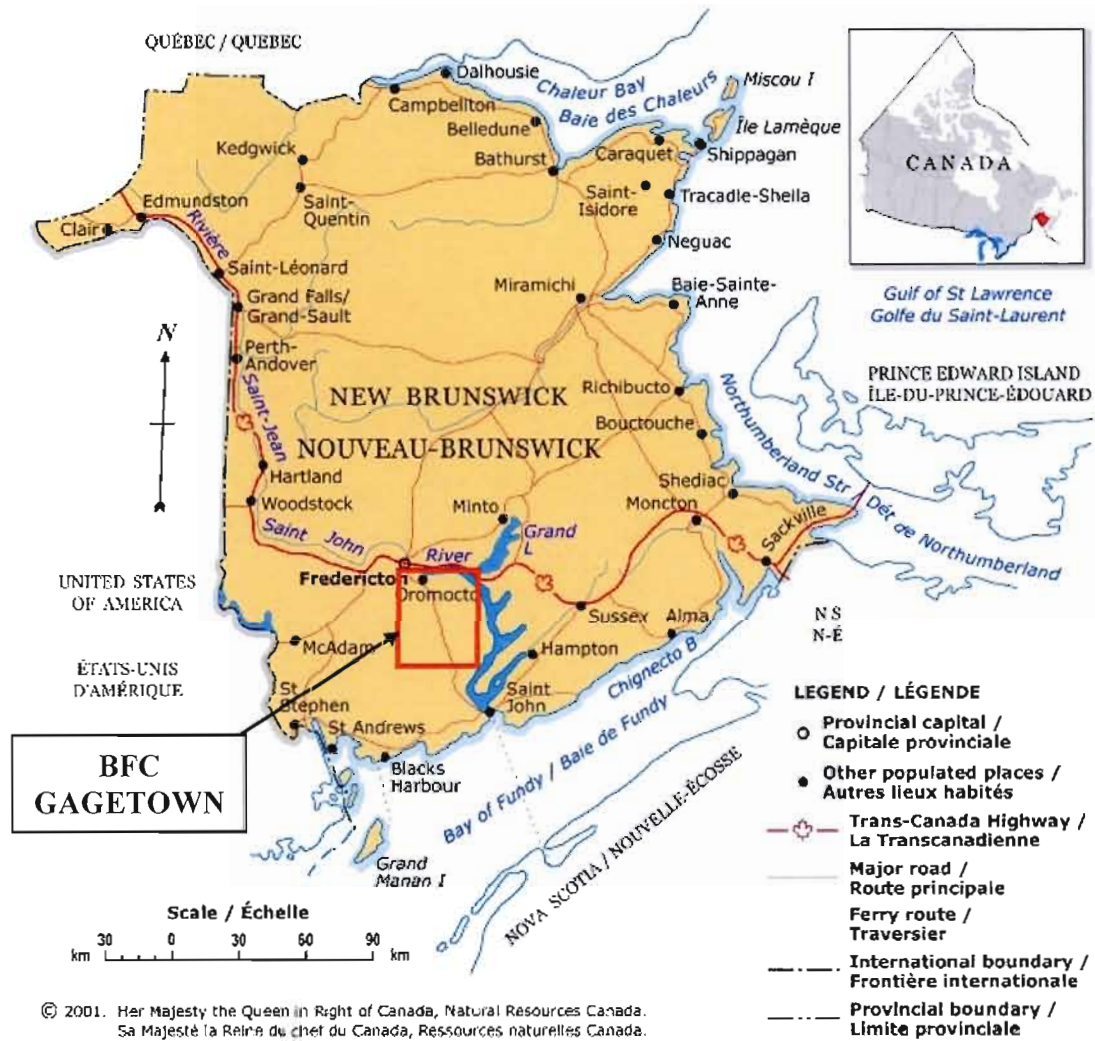


Fig. A.1. Localisation de la Base des Forces Canadiennes (BFC) Gagetown, NB, Canada.

RÉFÉRENCES GÉNÉRALES

- Abdul-Rida, A.M.M. et M.B., Bouché. 1997. Earthworm toxicology: From acute to chronic tests. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 29, p. 699-703.
- Akhavan, J. 1998. The chemistry of explosives. First edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 173 p.
- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, vol. 34, p. 4259-4265.
- Alexander, M., S.D., Cunningham, R.R., Chaney, J.B., Hughes et J., Harmsen. 2003. Chemical measures of bioavailability. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 345-362.
- Allen, H.E. 2002. Terrestrial ecosystems: An overview. In *Bioavailability of metals in terrestrials ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants* (H.E., Allen; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 1-5.
- Alloway, B.J. 1995. Heavy metals in soils. Second edition. Blackie Academic, London, UK, 368 p.
- Anderson, W.C., R.C., Loehr et B.P., Smith. 1999. Environmental availability of chlorinated organics, explosives, and metals in soils. American Academy of Engineers, Annapolis, MD, USA, 210 p.
- Baveye, P. et R., Bladon. 1999. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment: A critical perspective. In *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment: Practical Consequences for the Environment* (P., Baveye, J.C., Block et V.V., Goncharuk; Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 227-248.
- Belfroid, A., M., Sikkenk, K., van Gestel et J., Hermens. 1994. The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*), experiments in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, p. 93-99.
- Belfroid, A., W., Seinen, K., van Gestel, J., Hermens et K., van Leeuwen. 1995a. Modelling the accumulation of hydrophobic organic chemicals in earthworms: Application of the equilibrium partitioning theory. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 2, p. 5-15.

- Belfroid, A., W., Seinen, M., van den Berg, J., Hermens et K., van Gestel. 1995b. Uptake, bioavailability and elimination of hydrophobic compounds in earthworms (*Eisenia andrei*) in field-contaminated soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 14, p. 605-612.
- Belfroid, A.C., D.T.H.M., Sijm et C.A.M., van Gestel. 1996. Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environmental Reviews*, vol. 4, p. 276-299.
- Bengtsson, G., T., Gunnardsson et S., Rundgren. 1986. Effects of metal pollution on the earthworm *Dendrobaena rubida* (Sav.) in acidified soils. *Water Air and Soil Pollution*, vol. 28, p. 361-383.
- Bouché, M.B. 1992. Choice of earthworm species for laboratory tests. In *Ecotoxicology of earthworms* (P.W., Greig-Smith, H. Becker, P.J., Edwards et F. Heimbach; Eds.). Intercept, Andover, UK, p. 20-35.
- Bradham, K.D., E.A., Dayton, N.T., Basta, J., Schroder, M., Payton et R.P., Lanno. 2006. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, p. 769-775.
- Bricka, R.M., C.W., Williford et L.W., Jones. 1994. Heavy metal soil contamination at U.S. army installations: Proposed research and strategy for technology development. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS, USA. Technical Report IRRP-94-1, 79 p.
- Brown, P.J., S.M., Long, D.J., Spurgeon, C., Svendsen et P.K. Hankard. 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, vol. 57, p. 1675-1681.
- Card Jr, R.E. et R., Autenrieth. 1998. Treatment of HMX and RDX contamination. Amarillo National Resource Center for Plutonium, Amarillo, TX, USA. ANRCP-1998-2, 48 p.
- CCME (Conseil Canadien des Ministres de l'Environnement), 1999. Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement. Mise à jour 6.0 (Juillet 2006). Conseil Canadien des Ministres de l'Environnement, Winnipeg, MB, Canada.
- Chakraborty, D., R.P., Muller, S., Dasgupta et W.A., Goddard III. 2001. A detailed model for the decomposition of nitramines: RDX and HMX. *Journal of Computer-Aided Materials Design*, vol. 8, p. 203-212.

- Charbeneau, R.J., D.G., Linz, C.J., Newell, W.G., Rixey et J.A., Ryan. 2003. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 217-249.
- Cheng, J. et M.H., Wong. 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 36, p. 72-78.
- Chojnacka, K., A., Chojnacki, H., Górecka et H., Górecki. 2005. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Science of the Total Environment*, vol. 337, p. 175-182.
- Chung, N. et M., Alexander. 1999. Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, vol. 33, p. 3605-3608.
- Conder, J.M. et R.P., Lanno. 2000. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, vol. 41, p. 1659-1668.
- Conder, J.M., R.P., Lanno et N.T. Basta. 2001. Assessment of metal availability in smelter soil using earthworms and chemical extractions. *Journal of Environmental Quality*, vol. 30, p. 1231-1237.
- Conder, J.M. et R.P., Lanno. 2003. Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Soils and Sediments*, vol. 3, p. 13-20.
- Cooke, A.S., P.W., Greig-Smith et S.A., Jones. 1992. Consequences for vertebrate wildlife of toxic residues in earthworm prey. In *Ecotoxicology of earthworms* (P.W., Greig-Smith, H. Becker, P.J., Edwards et F. Heimbach; Eds.). Intercept, Andover, UK, p. 139-155.
- Cooper, P.W. 1996. Explosives engineering. Wiley-VCH, New York, NY, USA, 460 p.
- Cortet, J., A., Gomot-De Vauflery, N., Poinso-Balaguer, L., Gomot, C., Texier et D., Cluzeau. 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, vol. 35, p. 115-134.
- Dai, J., T., Becquer, J., Henri Rouiller, G., Reversat, F., Bernhard-Reversat, J., Nahmani et P., Lavelle. 2004. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 36, p. 91-98.
- Davies, B.E. 1995. Lead. In *Heavy metals in soils*, Second edition (B.J., Alloway; Ed.). Blackie Academic, London, UK, p. 206-223.

- Davies, N.A., M.E., Hodson et S., Black. 2003a. The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. *Environmental Pollution*, vol. 121, p. 55-61.
- Davies, N.A., M.E., Hodson et S., Black. 2003b. Is the OECD acute worm toxicity test environmentally relevant? The effect of mineral form on calculated lead toxicity. *Environmental Pollution*, vol. 121, p. 49-54.
- Dhainaut, A. et P., Scaps. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Revue Canadienne de Zoologie*, vol. 79, p. 233-253.
- Dickson, K.L., J.P., Giesy, R., Parrish et L., Wolfe. 1994. Summary and conclusions. In *Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions* (J.L., Hamelink, P.F., Landrum, H.L., Bergman et W.H., Benson; Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 221-230.
- Edwards, C.A. et P.J., Bohlen. 1992. The effects of toxic chemicals on earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 125, p. 23-100.
- Edwards, C.A. et P.J., Bohlen. 1996. Biology and ecology of earthworms. Third Edition. Chapman and Hall, London, UK, 426 p.
- Efroymson, R.A., M.E., Will et G.W., Suter II. 1997. Toxicological benchmarks for contaminants of potential concern for effects on soil and litter invertebrates and heterotrophic process: 1997 revision. Oak Ridge National Laboratory Report ES/ER/TM-126/R2, 151 p.
- Ehlers, L.J. et R.G., Luthy. 2003. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environmental Science and Technology*, vol. 37, p. 295A-302A.
- Epstein, S. et C.A., Winkler. 1952. Studies of RDX and related compounds: VII. Relation between RDX and HMX production in the Bachmann reaction. *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 30, p. 734-742.
- Fent, K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, vol. 205, p. 223-240.
- Gupta, S.K., M.K., Vollmer et R., Krebs. 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *Science of the Total Environment*, vol. 178, p. 11-20.
- Hopkin, S.P. 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier applied science, London, UK.
- Houx, N.W.H. et Aben, W.J.M. 1993. Bioavailability of pollutants to soil organisms via the soil solution. *Science of the Total Environment*, vol. 134, Supplément 1, p. 387-395.

- Ireland, M.P. 1983. Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworm. In *Earthworm ecology: From Darwin to vermiculture* (J.E., Satchell; Ed.). Chapman and Hall, London, UK, p. 247-265.
- ISO (International Organization for Standardization). 1998. Soil quality: effects of soil pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: determination of effects on reproduction. ISO, Geneva, Switzerland. International Standard ISO 11268-2, 16 p.
- Jager, T., R.H.L.J., Fleuren, E.A., Hogendoorn et G., de Korte. 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environmental Science and Technology*, vol. 37, p. 3399–3404.
- Jones, C.G., J.H., Lawton et M., Shachak. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, vol. 69, p. 373–386.
- Kammenga, J.E., R., Dallinger, M.H., Donker, H.R., Köhler, V., Simonsen, R., Triebkorn et J.M., Weeks. 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 164, p. 93-147.
- Lanno, R.P., A., Fairbrother, C., Gaudet, R., Loehr, A., Saterbak et H., Tabak. 2003. Introduction. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 1-8.
- Lanno, R., J., Wells, J., Conder, K., Bradham et N., Basta. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 57, p. 39–47.
- Labrot, F., D., Ribera, M., Saint-Denis et J.F., Narbonne. 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, vol. 1, p. 21-28.
- Lavelle, P. 1983. The structure of earthworm communities. In *Earthworm ecology: From Darwin to vermiculture* (J.E., Satchell; Ed.). Chapman and Hall, London, UK, p. 449-466.
- Lee, K.E. 1985. Earthworms: Their ecology and relationships with soils and land use. Academic Press, Sydney, Australia, 411 p.
- Lock, K. et C.R., Janssen. 2001. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: Taking soil parameters affecting the bioavailability into account. *Ecotoxicology*, vol. 10, p. 315-322.

- Lukkari, T., M., Taavitsainen, A., Väisänen et J., Haimi. 2004a. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 59, p. 340–348.
- Lukkari, T., M., Taavitsainen, M., Soimasuo, A., Oikari et J., Haimi. 2004b. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: Differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environmental Pollution*, vol. 129, p. 377–386.
- Ma, W. 2005. Critical body residues (CBRs) for ecotoxicological soil quality assessment: copper in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 37, p. 561–568.
- Ma, Y., N.M., Dickinson et M.H., Wong. 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 36, p. 79–86.
- Malecki, M.R., E.F., Neuhauser et R.C., Loehr. 1982. The effect of metals on the growth and reproduction of *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia*, vol. 24, p. 129–137.
- Marois, A., A., Gagnon, S., Thiboutot, G., Ampleman et M., Bouchard. 2004. Caractérisation des sols de surface et de la biomasse dans les secteurs d'entraînement, Base des Forces canadiennes, Valcartier. Recherche et Développement pour la Défense Canada - Valcartier, Département de la Défense Nationale du Canada. TR 2004-206, 78 p.
- McCarty, L.S. et D., Mackay. 1993. Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: Body residues and modes of toxic action. *Environmental Science and Technology*, vol. 27, p. 1719–1728.
- McMillen, S.J., C.A.M., van Gestel, R.P., Lanno, G.L., Linder, S.J., Pauwels et G.L., Stephenson. 2003. Biological measures of bioavailability. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 293–343.
- Menzie, C.A., R.A., Efroymson, S.J., Ells, G.M., Henningsen et B.K., Hope. 2003. Risk assessment and risk management. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 11–72.
- Menzies, N.W., M.J., Donn et P.M., Kopittke. 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 121–130.

- Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MEFQ). 1998. Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. TD878.4.C2B42. Publications du Québec, Québec, Canada, 124 p. Mis à jour en 2001 et accessible sur le site : <http://www.mddep.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/index.htm>
- Monteil-Rivera, F., C., Groom et J., Hawari. 2003. Sorption and degradation of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in soil. *Environmental Science and Technology*, vol. 37, p. 3878-3884.
- Morgan, J.E. et A.J., Morgan. 1988a. Calcium-lead interactions involving earthworms. Part 1: The effect of exogenous calcium on lead accumulation by earthworms under field and laboratory conditions. *Environmental Pollution*, vol. 54, p. 41-53.
- Morgan, J.E. et A.J., Morgan. 1988b. Calcium-lead interactions involving earthworms. Part 2: The effect of accumulated lead on endogenous calcium in *Lumbricus rubellus*. *Environmental Pollution*, vol. 55, p. 41-54.
- Morgan, J.E. et A.J., Morgan. 1989. The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligochaeta) chloragosome granule. *Histochemistry*, vol. 92, p. 237-241.
- Morgan, J.E. et A.J., Morgan. 1998. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. *Environmental Pollution*, vol. 99, p. 167-175.
- Morgan, A.J., S.R., Sturzenbaum, C., Winters et P., Kille. 1999. Cellular and molecular aspects of metal sequestration and toxicity in earthworms. *Invertebrate Reproduction and Development*, vol. 36, p. 17-24.
- Nahmani, J., M.E., Hodson et S., Black. 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 402-424.
- Nason, G.E., T.M., Carlsen, P.B., Dorn, J., Jensen et S.B., Norton. 2003. Soil-quality guidelines. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 73-116.
- Nriagu, J.O. et J.M., Pacyna. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, vol. 333, p. 134-139.
- NRC (National Research Council), 2003. Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, tools and applications. National Academies Press, Washington, DC, USA, 420 p.

- OCDE (Organisation pour la Coopération et le Développement Economique). 1984. Guideline for testing of chemicals: Earthworm, acute toxicity test. OCDE, Paris, France. Guideline No. 207, 9 p.
- Peijnenburg, W.J.G.M., L., Posthuma, H.J.P., Eijsackers et H.E., Allen. 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 37, p. 163-172.
- Peijnenburg, W.J.G.M., R., Baerselman, A.C., de Groot, T., Jager, L., Posthuma et R.P.M., van Veen. 1999. Relating environmental availability to bioavailability: Soil type dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 44, p. 294-310.
- Peijnenburg, W.J.G.M. 2002. Bioavailability of metals to soil invertebrates. In *Bioavailability of metals in terrestrials ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants* (H.E., Allen; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 89-112.
- Peijnenburg, W.J.G.M. et T., Jager. 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 56, p. 63-77.
- Pennington, J.C., T.F., Jenkins, G., Ampleman, S., Thiboutot, J.M., Brannon, A.D., Hewitt, J., Lewis, S., Brochu, E., Diaz, M.R., Walsh, M.E., Walsh, S., Taylor, J.C., Lynch, J., Clausen, T.A., Ranney, C.A., Ramsey, C.A., Hayes, C.L., Grant, C.M., Collins, S.R., Bigl, S., Yost et K., Dontsova. 2006. Distribution and fate of energetics on DoD test and training ranges: Final report. U.S. Army Engineer Research and Development Center, Environmental Laboratory, Vicksburg, MS, USA, 164 p.
- Philips, C. T., R. T. Checkai et R. S. Wentzel. 1993. Toxicity of selected munitions and munition-contaminated soil on the earthworm (*Eisenia foetida*). US Army Chemical and Biological Defense Agency, Edgewood Research, Development and Engineering Center, Research and Technology Directorate, Aberdeen Proving Ground, MD, USA. ERDEC-TR-037, 22 p.
- Ragnvaldsson, D., R., Berglind, M., Tysklind et P., Leffler. 2007. Environmental hazard screening of a metal-polluted site using pressurized liquid extraction and two *in vitro* bioassays. *Ambio*, vol. 36, p. 494-501.
- Raven, P.H., G.B., Johnson, J.B., Losos et S.R., Singer. 2005. Biology. Seventh edition. McGraw-Hill, Boston, MA, USA, 1250 p.
- Reinecke, A.J., S.A., Reinecke, D.E., Musilbono et A., Chapman. 2000. The transfer of lead (Pb) from earthworms to shrews (*Myosorex varius*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 39, p. 392-397.

- Reinecke, A.J. et S.A., Reinecke. 2003. The influence of exposure history to lead on the lysosomal response in *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 55, p. 30-37.
- Ribera, D. et M., Saint-Denis. 1999. Le ver *Eisenia fetida* : Intérêts et perspectives en écotoxicologie terrestre. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, vol. 124, p. 411-420.
- Rieuwerts, J.S., M.R., Ashmore, M.E., Farago et I., Thornton. 2006. The influence of soil characteristics on the extractability of Cd, Pb and Zn in upland and moorland soils. *Science of the Total Environment*, vol. 366, p. 864-875.
- Robidoux, P.Y., C., Svendsen, J., Caumartin, J., Hawari, G., Ampleman, S., Thiboutot, J.M., Weeks et G.I., Sunahara. 2000a. Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, p. 1764-1773.
- Robidoux, P.Y., G., Bardai, M., Sarrazin, L., Paquet, P., Gong, J., Hawari et G.I., Sunahara. 2000b. Ecotoxicological risk assessment of an antitank firing range contaminated with explosives. Institut de Recherche en Biotechnologie, Montréal, Québec, Canada. NRCC # 43317, 54 p.
- Robidoux, P.Y., J., Hawari, S., Thiboutot et G.I., Sunahara. 2001. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environmental Pollution*, vol. 111, p. 283-292.
- Robidoux, P.Y., J., Hawari, G., Bardai, L., Paquet, G., Ampleman, S., Thiboutot et G.I., Sunahara. 2002. TNT, RDX and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 43, p. 379-388.
- Robidoux, P.Y., P., Gong, M., Sarrazin, G., Bardai, L., Paquet, J., Hawari, C., Dubois et G.I., Sunahara. 2004a. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 58, p. 300-313.
- Robidoux, P.Y., C., Dubois, J., Hawari et G.I., Sunahara. 2004b. Assessment of soil toxicity from an antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei* in mesocosms and laboratory studies. *Ecotoxicology*, vol. 13, p. 603-614.
- Robidoux, P.Y., B., Lachance, L., Didillon, F.-O., Dion et G.I., Sunahara. 2006. Development of ecological and human health preliminary soil quality guidelines for energetic materials to ensure training sustainability of Canadian forces. Biotechnology Research Institute, Montreal, Quebec, Canada. NRCC # 45936, 145 p.

- Römbke, J., S., Jänsch et W., Didden. 2005. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 62, p. 249-265.
- Sanchez-Hernandez, J.C. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 188, p. 85-126.
- Saint-Denis, M., J.F., Narbonne, C., Arnaud et D., Ribera. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: Effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 33, p. 395-404.
- Sauvé, S., M., McBride et W., Hendershot. 1998. Soil solution speciation of lead (II): effect of organic matter and pH. *Soil Science Society of America Journal*, vol. 62, p. 618-621.
- Sauvé, S. 2002. Speciation of metals in soils. In *Bioavailability of metals in terrestrials ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants* (H.E., Allen; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 7-37.
- Savard, K. 2005. Evaluation des effets d'une exposition simultanée à des composés polynitro-organique et certains métaux chez le ver de terre. Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, 129 p.
- Savard, K., Y., Berthelot, A., Auroy, P., Spear, B., Trottier et P.Y., Robidoux. 2007. Effects of HMX-lead mixtures on reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 53, p. 351-358.
- Saxe, J.K., C.A., Impellitteri, W.J.G.M., Peijnenburg et H.E., Allen. 2001. A novel model describing heavy metal concentrations in the earthworm, *Eisenia andrei*. *Environmental Science and Technology*, vol. 35, p. 4522-4529.
- Scott-Fordsmand, J.J. et J.M., Weeks. 2000. Biomarkers in earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 165, p. 117-159.
- Scott-Fordsmand, J.J., D., Stevens et M., McLaughlin. 2004. Do earthworms mobilize fixed zinc from ingested soil? *Environmental Science and Technology*, vol. 38, p. 3036-3039.
- Semple, K.T., K.J., Doick, K.C., Jones, P., Burauel, A., Craven et H., Harms. 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology*, vol. 38, p. 228A-231A.
- Sijm, D., R., Kraaij et A., Belfroid. 2000. Bioavailability in soil or sediment: Exposure of different organisms and approaches to study it. *Environmental Pollution*, vol. 108, p. 113-119.

- Simini, M., R.T., Checkai, R.G., Kuperman, C.T., Phillips, J.E., Kolakowski, C.W., Kurnas et G.I., Sunahara. 2003. Reproduction and survival of *Eisenia fetida* in a sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia*, vol. 47, p. 657-662.
- Spurgeon, D.J., S.P., Hopkin et D.T., Jones. 1994. Effects of cadmium, copper, lead, and zinc on growth, reproduction, and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, vol. 84, p. 123-130.
- Spurgeon, D.J. et S.P., Hopkin. 1995. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology*, vol. 4, p. 190-205.
- Spurgeon, D.J. et S.P., Hopkin. 1996. Effect of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia*, vol. 40, p. 80-96.
- Spurgeon, D.J., H., Ricketts, C., Svendsen, A.J., Morgan et P., Kille. 2005. Hierarchical responses of soil invertebrates (earthworms) to toxic metal stress. *Environmental Science and Technology*, vol. 39, p. 5327-5334.
- Spurgeon, D.J., S., Lofts, P.K., Hankard, M., Toal, D., McLellan, S., Fishwick et C., Svendsen. 2006. Effect of pH on metal speciation and resulting metal uptake and toxicity for earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, p. 788-796.
- Svendsen, C., G., Paton et J.M., Weeks. 2002. Soil biomarkers (invertebrates and microbes) for assessing site toxicity. In *Environmental analysis of contaminated sites* (G.I., Sunahara, A.Y., Renoux, C., Thellen, C.L., Gaudet et A., Pilon; Eds.). Wiley, Chichester, UK, p. 95-133.
- Svendsen, C., D.J., Spurgeon, P.K., Hankard et J.M., Weeks. 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: Is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 57, p. 20-29.
- Talmage, S.S., D.M., Opresko, C.J., Maxwell, C.J.E., Welsh, F.M., Cretella, P.H., Reno et F.B., Daniel. 1999. Nitroaromatic munition compounds: Environmental effects and screening values. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 161, p. 1-156.
- Tang, J. et M., Alexander. 1999. Mild extractability and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 2711-2714.

- Thiboutot, S., G., Ampleman, A., Marois, A., Gagnon, M., Bouchard, A., Hewitt, T. F., Jenkins, M. E., Walsh, K., Bjella, C., Ramsey et T. A., Ranney. 2004. Environmental conditions of surface soils, CFB Gagetown training area: delineation of the presence of munitions related residues (phase III, final report). Recherche et Développement pour la Défense Canada - Valcartier, Département de la Défense Nationale du Canada. TR 2004-205, 59 p.
- Tomson, M.B., H.E., Allen, C.W., English, W.J., Lyman et J.J., Pignatello. 2003. Contaminant-soil interactions. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 251-290.
- Udovic, M. et D., Lestan. 2007. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after soil remediation. *Environmental Pollution*, vol. 148, p. 663-668.
- Udovic, M., Z., Plavc et D., Lestan. 2007. The effect of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere*, vol. 70, p. 126-134.
- USACHPPM (United States Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine). 2001. Wildlife toxicity assessment for High Melting Explosive (HMX). Aberdeen Proving Ground, MD, USA. Document No. 39-EJ-1138-01E, 21 p.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1989. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. Environmental Research Laboratory, Corvallis, OR, USA. EPA/600/3-88/029, 102 p.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2005. Ecological Soil Screening Levels for lead: Interim final. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC, USA. OSWER Directive 9285.7-70, 211 p.
- Van Gestel, C.A.M. et W.A., van Dis. 1988. The influence of soil characteristics on the toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils*, vol. 6, p. 262-265.
- Van Gestel, C.A.M. et W.-C., Ma. 1988. Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms in relation to bioavailability in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 15, p. 289-297.
- Van Gestel, C.A.M. et W.-C., Ma. 1990. An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere*, vol. 21, p. 1023-1033.

- Van Straalen, N.M. 1996. Critical body-residues: Their use in bioindication. In *Bioindicator systems for soil pollution* (N.M., van Straalen et D.A., Krivolutsky; Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 5–16.
- Van Wensem, J., J.J., Vegter et N.M., van Straalen. 1994. Soil quality criteria derived from critical body concentrations of metals in soil invertebrates. *Applied Soil Ecology*, vol. 1, p. 185–191.
- Venter, J.M. et A.J., Reinecke. 1988. The life-cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African Journal of Zoology*, vol. 23, p. 161–165.
- Vijver, M.G., J.P.M., Vink, C.J.H., Miermans et C.A.M., van Gestel. 2003. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 35, p. 125–132.
- Wen, B., X., Hu, Y., Liu, et W., Wang. 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 40, p. 181–187.
- Wen, B., Y., Liu, X., Hu et X., Shan. 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere*, vol. 63, p. 1179–1186.
- Wingfors, H., C., Edlund, L., Hägglund, A., Waleij, J., Sjöström, R.-M., Karlsson, P., Leffler, U., Qvarfort, M., Ahlberg, S., Thiboutot, G., Ampleman, R., Martel, W., Duvalois, A., Creemers et N., van Ham. 2006. Evaluation of the contamination by explosives and metals in soils at the Älvdalen shooting range. Part II: Results and Discussion. FOI-Swedish Defence Research Agency, NBC Defence, Umeå, Sweden. FOI-R-1877-SE, 47 p.
- Yinon, J. 1990. Toxicity and metabolism of explosives. CRC Press, Boston, MA, USA, 171 p.
- Zorn, M.I., C.A.M., van Gestel et H., Eijsackers. 2005a. The effect of two endogeic earthworm species on zinc distribution and availability in artificial soil columns. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 37, p. 917–925.
- Zorn, M.I., C.A.M., van Gestel et H., Eijsackers. 2005b. The effect of *Lumbricus rubellus* and *Lumbricus terrestris* on zinc distribution and availability in artificial soil columns. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 41, p. 212–215.